ÜBER DEN EINFLUSS VON SUBSTANZEN, DIE VON PILZEN GEBILDET WERDEN, AUF DIE ATMUNG DES KARTOFFELKNOLLENGEWEBES

von

J. J. A. HELLINGA

(Mit Tafel V).

INHALTSVERZEICHNIS.

Seite

Abschn. I. Einleitung und Fragestellung 154

Abschn. II. Methodik und Material 159
1. Atmungsapparatur 159
2. Atmungsmaterial 161
a. Versuche mit künstlich infizierten Knollenteilen . . 161
b. Versuche mit atmungsaktivierenden Stoffen. . . . 163
3. Pilzmaterial 164
4. Herstellung der Extrakte 165
a. Myzelextrakt 165
b. Kulturflüssigkeit 166
c. Extrakt vom infizierten Kartoffelgewebe 166
5. Sterilität. 166
6. Versuchsanordnung und Darstellungsweise der Resultate. 168

Abschn. III. Die Atmung des Kartoffelknollengewebes und der Einfluss einiger Versuchsbedingungen. . . . 170
1. Literaturbesprechung 170
2. Der Einfluss einiger methodischer Faktoren auf die Atmung 173
a. Die Dimensionen der Schnitten. 173
b. Die Zahl der Schnitten 174
c. Die Natur der Suspensionsflüssigkeit 174
d. Der pH-Wert der Suspensionsflüssigkeit 176
e. Die Schüttelgeschwindigkeit. 177
f. Die Vorbehandlung des Kartoffelgewebes. 177
3. Die Atmungsgrösse in verschiedenen Teilen der Knolle 180

Seite

a. Vergleichung der basalen und apikalen Teile . . . 180
b. Vergleichung vom Gewebe innerhalb und ausserhalb des Gefässbündelringes 181
4. Der respiratorische Quotient des Kartoffelgewebes . . 182
a. Gewebezylinder 182
b. Gewebeschnitten. 182
5. Die Atmungsgrösse im Laufe des Jahres 183
Abschn. IV. DIE ATMUNG DES INFIZIERTEN KARTOFFELGEWEBES 185
Abschn. V. DER EINFLUSS VON STOFFEN, VOM PILZ IN REINKULTUR GEBILDET, AUF DIE ATMUNG DES KARTOFFELGEWEBES 187
1. Myzelextrakte von *Gibberella Saubinetii* und von einigen anderen Pilzen (Extrakt I). 189
a. Extrakte von Myzelien aus verschiedenen Kulturen 189
b. Wirkung der Extrakte in starker Verdünnung. . . 192
c. Atmungserhöhung oder Oxydation? 197
d. Extraktwirkung und Blausäurehemmung 198
e. Thermostabilität 200
f. Löslichkeit in Äthylalkohol 201
g. Löslichkeit in Äther und in Chloroform 202
h. Aktivität nach Veraschung. 204
i. Adsorption an das Seitz-Filter und an Kohle. . . 204
j. Extrakt aus Myzelien, gebildet in durchlüfteter und in nicht-durchlüfteter Kultur 208
k. Wirkung auf die Atmung von Gewebezylindern. . 210
l. Wirkung auf die Atmung frischgeschnittener Scheibchen 212
m. Bariumfällung 212
n. Extrakte verschiedener Pilze 213
o. Zusammenfassung 217
2. Kulturfiltrate von *Gibberella Saubinetii* und von einigen anderen Fusarien (Extrakt II) 218
a. Adsorption an das Seitz-Filter und an Kohle. . . 219
b. Löslichkeit in Äther und in Chloroform 219
c. Filtrate durchlüfteter und nicht-durchlüfteter Kulturen. 221
d. Schnelle Bildung der aktiven Stoffe in Reinkultur . 222
e. Extrakte verschiedener Fusarien. 224
f. Aktivität nach Verdünnung 224
g. Das wirksame Prinzip ist nicht flüchtig 225
h. Bariumfällung 225
i. Zuckerfreier Extrakt 228
j. Elution der adsorbierten wirksamen Stoffe 229

Seite

k. Der hemmende Faktor des *F. trichothecioides*-Extrakts 231
l. Thermostabilität 236
m. Wirkung auf die Atmung von Gewebezylindern. . 238
n. Zusammenfassung 238

Abschn. VI. Der Einfluss von Stoffen, in parasitischen Verhältnissen gebildet, auf die Atmung des Kartoffelgewebes (Extrakt III). 239
a. Wirkung wässeriger und alkoholischer Extrakte . . 240
b. Adsorption an das Seitzfilter 242
c. Adsorption an Kohle. 242
d. Wirkung auf die Atmung frischgeschnittener Scheibchen 244
e. Löslichkeit in Äther 245
f. Löslichkeit in Chloroform 245
g. Thermostabilität 246
h. Wirkung nach Verdünnung 248
i. Zusammenfassung 248

Abschn. VII. Der Einfluss von Zuckern auf die Atmung des Kartoffelgewebes („Zuckereffekt") 249

Abschn. VIII. Das Vorkommen atmungsaktivierender Stoffe in anderen Rohprodukten, im Zusammenhang mit der Anwesenheit einiger Wirkstoffe 256
1. Der Einfluss von Rohpepton und Hefeextrakten auf die Atmung des Kartoffelgewebes 256
2. Das Vorkommen des Aneurins in den Pilzextrakten . 258
3. Die Bioswirkung 260

Abschn. IX. Der einfluss einer Anzahl chemischer Verbindungen auf die Atmung des Kartoffelgewebes . . 264
1. Vitamine, Bioskomponenten und andere Wirkstoffe . 264
2. β-Indolyl-Essigsäure (Heteroauxin) 270
3. Histidin 272
4. Andere Stoffe 272
a. Amine 272
b. Ammoniumverbindungen 274
c. Aminosäuren 274
d. Phenolderivate. 275

Abschn. X. Diskussion der Ergebnisse. 276

Literaturverzeichnis 283

Will man in der Bekämpfung der Pflanzenkrankheiten über das Stadium des Bespritzens und des Totschlagens hinauskommen, so muss man erst in das Wesen der Pflanzenkrankheiten eindringen.

GÄUMANN (1930)

ABSCHNITT I.

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.

Wie reagiert die höhere Pflanze im physiologischen Sinne auf den Befall von parasitischen Pilzen? Diese Frage bildet den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

Man kennt in vielen Fällen die morphologisch-anatomischen Vorgänge, die mit dem Befall im Zusammenhang stehen, man verfügt über genaue Beobachtungen der Veränderungen in den Zellen der Wirtspflanze, wie z.B. Zellteilungen, Umbildung der Kerne und der Chromoplasten, Absterben des Zellinhalts, Zerstörung des Zellverbands durch Auflösen der Mittellamellen, u.s.w. Ausserdem kennt oder vermutet man die Bildung von Ausscheidungsprodukten durch den Krankheitserreger, die auf die Wirtspflanze einwirken und entweder enzymatischer Natur sind, wie Pektinase (BROWN, 1915), oder eine giftige (toxische) oder „reizende" Wirkung ausüben. Weiter haben eine Anzahl von Untersuchungen ergeben, dass den Änderungen des Zellgefüges entsprechend die physiologischen Leistungen der befallenen Teile der Wirtspflanze (Transpiration, Assimilation, Atmung, u.s.w.) gewisse Veränderungen aufweisen.

Wenn man auch gewissermassen bekannt sein mag mit den Ursachen und den Folgen des parasitären Krankheitsprozesses, so ist der feinere physiologische Mechanismus des Parasiten und der Wechselbeziehung zwischen Krankheitserregern und Wirtspflanze jedoch noch weitgehend unaufgeklärt.

Die physiologischen Hintergründe vom parasitären Vermögen des Pilzes und von der Resistenz der Wirtspflanze sind zwar Gegenstand von vielen Untersuchungen gewesen; die Umweltfaktoren, die Virulenz und Resistenz beherrschen, mögen in vielen Fällen eingehend untersucht, mehrere mechanische und chemische Resistenzfaktoren bekannt geworden sein, die Grundlagen der reaktiven Resistenz (ROEMER, FUCHS u. ISENBECK, 1938) und die Faktoren der potentiellen physiologischen Unterschiede zwischen obligaten und gelegentlichen Parasiten und zwischen Parasiten und Saprophyten sind dagegen bis heute noch vielfach unbekannt geblieben.

Dies ist in grossen Umrissen unsere Kenntnis der parasitären Physiologie. Eine ausführliche Übersicht über die Tatsachen und Probleme auf diesem Gebiete gab BROWN (1936), der mit seinen Mit-

arbeitern in manchen wichtigen Arbeiten einige Fragen der Physiologie der Pilzkrankheiten studierte.

Über etwaige Abänderungen des Wirtspflanzenstoffwechsels infolge der Infektion liegen noch nicht viele Untersuchungen vor; von diesen lieferten ausserdem manche, wegen ihrer primitiven Versuchstechnik, nur schwankende und wenig zuverlässige Ergebnisse. FISCHER u. GÄUMANN (1929) zitieren eine Reihe Forscher auf diesem Gebiete und auch ROEMER, FUCHS u. ISENBECK (1938) geben eine Übersicht über die Untersuchungen der physiologischen Beeinflussung der Wirtspflanzen durch die parasitären Krankheiten. Die meisten Arbeiten beziehen sich jedoch auf Krankheiten, hervorgerufen durch Rost-, Brand- und Mehltaupilze, also von obligaten Parasiten, und die dabei erzielten Ergebnisse sind nicht ohne weiteres gültig für die Einwirkungen bei kranken Pflanzen, die von Krankheitserregern aus anderen Gruppen befallen worden sind.

Im grossen und ganzen lässt sich jedoch feststellen, dass die physiologische Beeinflussung der Wirtspflanze eine Steigerung der Transpiration und der Atmung und eine Herabsetzung der Assimilation herbeiführt.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit interessiert uns hier namentlich die Atmung der kranken Pflanze, die eine Intensivierung des Stoffwechsels verrät. In einer kurzen Literatur-Übersicht sollen jetzt die diesbezüglichen Arbeiten umfasst werden.

KOURSSANOW (1928) untersuchte die Kohlensäure-Abgabe von brandinfizierten Weizenpflanzen und beobachtete bei jungen, sowohl als bei älteren Pflanzen um eine 20%—40 % erhöhte Atmung.

MARESQUELLE (1928, 1930) bestimmte die Sauerstoff-Aufnahme der von Rosten befallenen Pflanzenteile und fand eine bedeutende Erhöhung der Atmung, besonders vor der Sporenbildung des Parasiten. Die nicht-infizierten Teile zeigten hingegen keine oder eine nur unbedeutende Atmungssteigerung. Er schreibt den Mehrverbrauch zunächst der eigenen Atmung des Parasiten zu, dessen physiologische Wirkung eine sich ernährende, ohne starke Giftwirkung, sein soll.

NICOLAS (1913, 1920) kam zu ähnlichen Erfolgen mit anderen Endoparasiten (Rost- und Brandpilze). Er glaubt jedoch die höhere Atmung damit erklären zu können, dass der Parasit eine Hypertrophie und damit einen Zufluss von Nährstoffen herbeiführt und auf diese Weise günstigere Bedingungen für die Atmung der Wirtspflanze schafft. Dagegen wurde die Atmung unter dem Einfluss von Ektoparasiten, wie Russtau- und Mehltaupilzen, herabgesetzt und zwar angeblich auf rein mechanische Weise durch Beeinträchtigung des Gaswechsels.

SCHNEIDER-ORELLI (1911) konstatierte bei Birnen mit *Monilia*-Fäule eine achtfach gesteigerte Kohlensäure-Entwicklung, die er eher der hohen Atmung des Parasiten, als einer „Reizwirkung" in den Zellen der Wirtspflanze zuschreibt.

WEIMER u. HARTER (1921) erhielten mit Bataten, befallen von *Rhizopus tritici*, auch eine vielfach erhöhte Kohlensäure-Abgabe.

SCHELLENBERG (1915) zeigte, dass Hexenbesen von *Taphrina cerasi* auf Kirschbäumen, auf das Trockengewicht bezogen, eine bedeutend höhere Atmung aufweisen.

In allen diesen Fällen wurde die Atmungsgrösse des Komplexes Wirtspflanze-Parasit bestimmt und die Frage, in wiefern die eigene Atmung des Parasiten am ganzen beteiligt war, lässt sich von vornherein nicht beantworten. Ohne diese Feststellung kann jedoch nicht entschieden werden ob und in welchem Masse es sich in jedem Einzelfall auch um eine Atmungssteigerung der Wirtspflanze über das Normale hinaus handelt.

Einige Forscher haben sich daher bemüht, diese Frage aufzuklären. Auch ihre Arbeiten sollen kurz erwähnt werden.

EGLITS (1933) studierte den Einfluss der Infektion von Kartoffelknollen mit *Bacillus phytophthorus* auf die Temperatur und die Kohlensäureabgabe und konnte feststellen, dass nicht nur in den infizierten Gewebeteilen sondern auch im umgebenden „normalen" Gewebe die Temperatur und die Atmung, allerdings im Anfangsstadium der Krankheit, eine Erhöhung aufwiesen. Diese Erscheinungen waren an das *lebende* Gewebe gebunden und sollten von „Toxinen", vom Krankheitserreger gebildet, hervorgerufen werden. GÄUMANN (1930) spricht in dieser Beziehung von einem Fieberzustand der Wirtspflanze, als Abwehrreaktion gegen den eingedrungenen Parasiten und hält es für eine wichtige Aufgabe beim Studium der Pflanzenkrankheiten das Wesen dieser Abwehrreaktion zu ergründen.

YARWOOD (1934) inokulierte Kleeblätter mit *Erisyphe polygoni* und fand die Atmung der Blätter nach einiger Zeit um etwa 40 % erhöht, welche Erhöhung sich behauptete, nachdem der Pilz mittels Schwefelkohlenstoff getötet worden war. Hieraus wurde die Folgerung gezogen, dass die Atmungssteigerung hauptsächlich einer Atmungsstimulation der Wirtspflanze, ausgelöst vom Parasiten, zuzuschreiben wäre. Eine ähnliche Erfahrung machte PRATT (1938), der *Erisyphe graminis tritici* auf Weizenkeimlingen durch Bestäubung mit Schwefelpulver abtötete und ebenfalls keine wesentliche Herabsetzung der erhöhten Atmung erzielte.

Von ALLEN u. GODDARD (1938) wurde eine sinnreiche Methode zur Anwendung gebracht um die eigene Atmung des Parasiten

(gleichfalls Mehltau auf Weizenkeimlingen) zu ermitteln, dadurch, dass sie die Atmung der sorgfältig abgetrennten Epidermis der Weizenblätter (mit und ohne Mehltau) massen.

Es zeigte sich auch hier, dass die bedeutend erhöhte Atmung nur zum kleineren Teile auf die eigene Atmung des Mehltaupilzes zurückzuführen war. Die Atmungssteigerung des Wirtsgewebes wäre, nach diesen Forschern, wahrscheinlich durch die grössere Menge oxydierbaren Substrats hervorgerufen. Diese wurde durch Vermittlung einer vom Pilz oder von der infizierten Epidermis stammenden Substanz zur Verfügung gestellt. Anatomisch liess sich keine Schädigung der Wirtspflanze feststellen und die Krankheit wäre in diesem Falle eine physiologische Störung als Folge der abnorm hohen Atmung, bei der, aus Mangel an Atmungssubstrat, eine Aushungerung auftritt und die Wirtspflanze schliesslich eingeht. Bemerkenswert in dieser Darstellung ist, dass die vom Parasiten ausgeübte Wirkung auf einen enzymatisch wirksamen Faktor zurückgeführt wird und dass hier nicht die Rede ist von unbestimmten Begriffen, wie „Reizwirkung".

Für das Studium der Physiologie des Wirtspflanze-Parasit-Komplexes kommt tatsächlich zunächst die Atmung in Betracht. Diese Lebensfunktion der Pflanze ist am meisten geeignet einen Eindruck von etwaigen Änderungen des Stoffwechsels zu geben.

Nach einigen Versuchen in anderer Richtung wurde ein geeignetes Objekt im Kartoffelknollengewebe gefunden. Dies konnte leicht mit einem Pilz inokuliert werden, der, wie es sich zufälligerweise zeigte, auf lebenden, gesunden Teilen der Kartoffelknollen ein gutes Wachstum aufweist und im Gewebe eine Fäule hervorruft.

Das Problem der vorliegenden Untersuchung lässt sich in den folgenden Fragen stellen:

1. Tritt auch in diesem Falle eine erhöhte Atmung auf?
2. In welchem Masse ist die eigene Atmung des Pilzes an dieser Erhöhung beteiligt?
3. Wenn diese nicht für die gesamte Mehratmung verantwortlich sein sollte und also auf eine gesteigerte Atmung des Wirtspflanzengewebes geschlossen werden müsste, auf welche Ursachen wäre dann diese Steigerung zurückzuführen?

Orientierende Versuche zeigten, dass die erste Frage im bejahenden Sinne beantwortet werden konnte, da auch im vorliegenden Falle die Atmung des befallenen Gewebes der des nicht-infizierten Gewebes — wenigstens in den ersten Befallsstadien — bedeutend überlegen war. Für die unmittelbare Beantwortung der zweiten Frage wär

eine Trennung von Wirtspflanze und Parasiten notwendig gewesen. Nur in einzelnen der oben erwähnten Arbeiten (YARWOOD, ALLEN u. GODDARD) ist es gelungen ein solches Verfahren durchzuführen. Es handelte sich in diesen Fällen jedoch um Ektoparasiten (Mehltaupilze), mit denen es sich ziemlich gut arbeiten lässt ohne den ganzen Komplex Wirtspflanze-Parasit zu zerstören. Im vorliegenden Falle einer Fäule-Krankheit war es ausgeschlossen Parasit und Wirtspflanze nach Eintritt der Wechselbeziehung zu trennen oder den Parasiten abzutöten ohne die Wirtspflanze zu schädigen. Damit konnte eine etwaige erhöhte Atmung des Wirtspflanzengewebes unter dem Einfluss des Parasiten nicht unmittelbar festgestellt werden.

Es wurde daher versucht das Problem auf eine andere Weise zu lösen. Die folgende Arbeitshypothese wurde aufgestellt: *der Stoffwechsel — und damit die Atmung — der Wirtspflanze kann direkt oder indirekt aktiviert werden von Substanzen die vom Pilze während des parasitären Vorgangs ausgeschieden werden.* Wenn es sich herausstellen würde, dass tatsächlich die Anwesenheit von solchen „atmungsaktivierenden" Stoffen nachzuweisen ist, so würde dies nicht nur einen starken Grund liefern für die Annahme, dass die kranke Pflanze unter dem Einfluss des Parasiten, wenigstens zeitweise, einen gesteigerten respiratorischen Stoffwechsel aufweist, sondern man könnte auch eine tiefere Einsicht in das Wesen das Parasit-Wirtspflanze-Verhältnisses bekommen. Damit wäre zu gleicher Zeit dem ursprünglichen Zweck dieser Arbeit wesentlich gedient.

Die nächste Aufgabe war also zu untersuchen, ob im System Wirtspflanze-Parasit oder vom Parasiten in Reinkultur Substanzen gebildet werden, welche die Atmung vom Gewebe der höheren Pflanze beeinflussen.

Zu diesem Zweck wurden Extrakte, sowohl vom befallenen Kartoffelgewebe, als auch vom Pilzmyzel, gebildet in Reinkulturen, hergestellt. Diese Auszüge, sowie die Kulturflüssigkeit nach Entfernung der Pilzmyzelien und der Konidien, wurden darauf in Atmungsversuchen mit Kartoffelknollengewebe auf ihre physiologische Wirkung geprüft.

Es stellte sich bald heraus, dass diese gesamten Flüssigkeiten tatsächlich eine atmungsaktivierende Wirkung hervorrufen. Daher ist der grössere Teil dieser Arbeit den Versuchen mit diesen Extrakten und Filtraten gewidmet, sowie der Untersuchung der sich in diesen befindlichen wirksamen Stoffe.

Die Ergebnisse der hier nicht veröffentlichten Orientierungsversuche, — die erhöhte Atmung des infizierten Kartoffelgewebes und die aktivierende Wirkung der Extrakte — die mit einem

Barcroft-Respirationsapparat ausgeführt wurden, konnten in Versuchen mit der manometrischen Warburg-Apparatur, die sich besser zur Erzielung von exakten und reproduzierbaren Ergebnissen eignet, bestätigt werden.

Der Darstellung der Versuche mit den Extrakten wird die Besprechung einiger vergleichenden Versuche mit inokuliertem und sterilem, nicht-inokuliertem Gewebe vorangehen (Abschn. IV). In jedem Abschnitt wird jedesmal, des logischen Aufbaus halber, die diesbezügliche Literatur kurz besprochen.

Eine vorläufige Mitteilung (HELLINGA, 1940), welche die wichtigsten Resultate dieser Arbeit umfasst, ist bereits früher veröffentlicht worden.

ABSCHNITT II.

METHODIK UND MATERIAL.

1. Atmungsapparatur.

Zur Messung der Atmung benutzten wir die von WARBURG ausgearbeitete manometrische Methode. Die zur Verfügung stehenden acht Manometer vom üblichen einfachen Typ waren auf eine Schüttelvorrichtung angebracht, welche die Manometergefässe rotieren liess. Die Versuchströge, vom konischen Modell mit einem Volumen von ca. 20 cm^3, waren mit einem zentralen Kalilaugeeinsatz und mit einer Birne (Seitengefäss) ausgestattet. Die Versuche wurden in einem elektrisch geheizten und regulierten Wasser-Thermostaten bei einer Temperatur von 25° C. angestellt. Die Temperaturschwankungen beliefen sich auf nicht mehr als 0.1°, meistens nur auf einige hundertstel Grad. Mit einer Geschwindigkeit von 220—280 Rotationen in der Minute wurde geschüttelt.

Als Sperrflüssigkeit der Manometer wurde die gefärbte BRODIEsche Flüssigkeit benutzt. Das Volumen des Versuchsraumes hielten wir auf die übliche Weise konstant, indem die Sperrflüssigkeit durch eine Schraube aus einem Gummischlauch gepresst und der Meniskus auf die Nullmarke verschoben wurde. Die auftretenden Gasdruckveränderungen wurden mit Hilfe eines Spiegels abgelesen. Die Ablesung geschah bis auf 0.1 mm; die Dezimalzahl wurde geschätzt und erfahrungsgemäss betrug die Genauigkeit 0.2—0.3 mm, einem Volumenfehler von höchstens 0.6 mm^3 entsprechend.

Einer der Manometer wurde ohne lebendes Material mitbeobachtet und diente als Thermobarometer zur Ermittelung der Schwan-

kungen der Temperatur und des äusseren Atmosphärendrucks. Die abgelesenen Druckveränderungen in den übrigen Manometergefässen wurden, nach erfolgter Korrektion, mit Hilfe der Gefässkonstanten in Volumänderungen umgerechnet. Die Gefässkonstanten waren vorher berechnet nach der von WARBURG (1928) gegebenen Formel:

$$x = h\left[\frac{V_M + V_G}{V_G} \times \frac{V_G\frac{273}{T} + \alpha V_F}{P_0}\right] = hK.$$

In dieser Formel sei:

x die fragliche Gasmenge in mm^3 (bei 0° und 760 mm).
h die beobachtete Druckänderung in mm.
V_M das Volumen der Manometercapillare bis zum Meniskus der Sperrflüssigkeit, in mm^3.
V_G das Volumen der Gasphase im Troge, in mm^3.
V_F das gesamte Volumen der Flüssigkeiten im Troge, in mm^3.
T die absolute Versuchstemperatur.
α der Absorptionskoeffizient des entstehenden oder verschwindenden Gases.
P_0 der Normaldruck in mm Sperrflüssigkeit (= 10.000).
K die Gefässkonstante.

Jedoch die folgenden Vereinfachungen wurden vorgenommen:

1. da V_M sehr klein war im Verhältnis zu V_G, wurde $\frac{V_M + V_G}{V_G} = 1$ gesetzt und für V_G das Volumen der Gefässe einschliesslich der Capillare bis zur Nullmarke genommen.
2. für α wurden die Absorptionskoeffizienten von O_2 oder CO_2 in Wasser genommen, während die Flüssigkeitsmenge im Gefäss aus Phosphatpufferlösung, Lauge und Kartoffelgewebe bestand.

Die konstanten Fehler, die dabei gemacht wurden, waren für alle Gefässe annähernd gleich und übten auf die Resultate einen nur so geringen Einfluss aus, dass dieselben vernachlässigt werden konnten.

Das Volumen der Versuchsgefässe wurde durch Auswiegen mit Quecksilber bestimmt.

Die Ablesungen erfolgten gewöhnlich in Abständen von einer Stunde; der Thermobarometer wurde vor und nach den sieben anderen Manometern abgelesen, deren Stand immer in der gleichen Reihenfolge bestimmt wurde, um Differenzen, durch die Dauer der Ablesung entstanden, möglichst zu beseitigen.

Bei Anwesenheit starker Lauge wurde die im Atmungsvorgang gebildete Kohlensäure schnell absorbiert, so dass die negative Druckänderung im Gefäss ein Mass für die verschwundene Sauerstoffmenge darstellte.

Zur Berechnung des respiratorischen Quotienten (R.Q. = das Verhältnis entwickelte CO_2/ verschwundene O_2) ist ausserdem die Bestimmung der Menge der gebildeten Kohlensäure notwendig.

Dazu wurde die von WARBURG u. YABUSOE (1924) beschriebene Methode gefolgt.

Um die benötigten Angaben zu gewinnen, wurden jeweils drei Gefässe benutzt, in welche gleiche Mengen lebenden Materials eingefüllt wurden. Eins der Gefässe wurde, wie üblich, mit Lauge im Einsatz, die beiden anderen mit Schwefelsäure in der Birne beschickt. Das erste Gefäss ergab die Menge O_2, die anderen die algebraische Summe der Mengen entwickelter CO_2 und verschwundenen O_2. Die Säure diente zur Austreibung der Kohlensäure aus dem Puffergemisch vor dem Anfang und nach der Beendigung des Versuchs, damit auch die während der Versuchszeit an die Flüssigkeitsphase abgegebene Menge CO_2 am Manometer beobachtet werden konnte.

Bei diesem Verfahren ist vorausgesetzt, dass die Atmung in den drei Gefässen völlig vergleichbar sei. Infolge der unvermeidlichen kleinen Variationen im lebenden Material beanspruchen die erzielten R.Q.-Werte keine sehr hohe Genauigkeit und es soll erfahrungsgemäss ein Fehler von 5 bis 10 % berücksichtigt werden.

2. Atmungsmaterial.

Es zeigt sich, dass das Kartoffelknollengewebe ein sehr geeignetes Atmungsobjekt darstellt.

Mit diesem ziemlich gleichmässigen Speichergewebe lässt sich leicht arbeiten und es lässt sich in Teile von gleicher Grösse zerlegen. Selbstverständlich war es nicht möglich das ganze Jahr hindurch mit Knollen von gleicher Herkunft zu arbeiten, aber die Varietätenzahl wurde möglichst klein gehalten. Von September bis Februar lieferte der Klon „Eigenheimer" das Material; von Februar bis Juni wurde der Klon „Bintje" und während des Sommers die mit den Namen „Malta" und „Muizen" bezeichneten konservierten oder frühen Kartoffeln verwendet. Die Knollen wurden in einem kühlen Keller aufbewahrt.

a. *Versuche mit künstlich infizierten Knollenteilen.* Unverletzte Knollen wurden mit einer Bürste gereinigt, äusserlich desinfiziert mit vierprozentigem Formalin oder 0.1 %iger Sublimatlösung und in nahezu sterilem Leitungswasser nachgespült. Mit einem in der Flamme sterilisierten Messer wurden die basalen und apikalen Teile der Knolle flach abgeschnitten, damit ein Mittelteil von ca. 40 mm Länge übrig blieb.

Hieraus wurden mit einem sterilen Korkbohrer parallel an der

Längenachse und gerade innerhalb des Gefässbündelringes eine Anzahl Gewebezylinder von 6 mm Durchmesser herausgeschnitten. Im sterilen Schneideapparat (eine Art Handmikrotom, s. unten) wurden alle Zylinder auf eine bestimmte Länge abgeschnitten und in sterilem Wasser aufgefangen. Auf diese Weise lieferte eine grössere Knolle 8 bis 10 Zylinder von gleichen Dimensionen und von vergleichbarer Beschaffenheit.

Ein Teil dieser Zylinder wurde darauf mit Konidiosporen des Pilzes geimpft. Es stellte sich bald heraus, dass eine gleichmässige Infektion durch kurzes Eintauchen der Gewebeteile in eine Sporensuspension erzielt werden konnte. Nach Abfliessen der anhängenden Flüssigkeit zwischen sterilem Filtrierpapier wurden alle Zylinder in sterile Kulturröhrchen gebracht und bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Das inokulierte Gewebe zeigte bereits nach einem Tage eine zunehmende Braunfärbung, während die sterilen Zylinder infolge der Verkorkung der äusseren Zellschichten erst langsam eine Verfärbung aufwiesen.

Alles erfolgte möglichst steril, aber vollständige Sterilität konnte bei diesem Verfahren nicht erzielt werden. Dennoch zeigten die nicht-infizierten Gewebezylinder nie eine natürliche Pilz-Infektion. Dies ist unzweifelhaft der baldigen Austrocknung der äusseren Schichten und der Bildung einer Korkschicht zuzuschreiben. Diese Austrocknung geschah allerdings langsam genug um den aufgetragenen Sporen das Keimen und das Eindringen in das Gewebe zu ermöglichen, denn nach einigen Tagen zeigten die geimpften Zylinder meistens eine dichte Luftmyzelentwicklung.

Nachher pflegte die anfängliche „Trockenfäule" in eine „Nassfäule" überzugehen, bei welcher der Zylinder schlaff und graufarbig und schliesslich breiig wurde.

In diesem parasitären Endstadium verloren die Zellen ihre Turgeszenz und gingen zu Grunde. Wahrscheinlich waren an der „Nassfäule" auch Bakterien beteiligt, die nach dem Befall des Gewebes vom Pilze zur Entwicklung gelangen konnten. Bakterien wurden nämlich oft mikroskopisch aufgefunden, wenn solche Zylinder zerrieben und extrahiert worden waren. Zuweilen trat jedoch die „Nassfäule" nicht auf und beschränkte der Befall sich auf die „Trockenfäule" des Kartoffelgewebes. In diesem Falle wurden Bakterien nicht oder nur in geringem Masse beobachtet.

Mit diesen Gewebezylindern fanden Atmungsversuche statt, bei denen die Zylinder geradständig in die Einsätze der Manometergefässe gestellt wurden, während die zur Absorption der Kohlensäure benutzte Lauge sich in diesem Falle im Hauptraum um den Einsatz herum befand.

b. *Versuche mit atmungsaktivierenden Stoffen.* In orientierenden Versuchen wurde das Kartoffelgewebe einfach eine Zeitlang in die zu untersuchende Lösung eingetaucht; darauf wurde der Einfluss auf die Atmungsgrösse bestimmt. Es zeigte sich bald, dass bei Verwendung von kleinen Gewebeschnitten im WARBURG-Apparat die Auffindung eines möglichen Einflusses auf einfache Weise und unter genauen Bedingungen stattfinden konnte. Dabei wurde grundsätzlich für das pflanzliche Gewebe die gleiche Methode angewandt, die WARBURG (1926) mit Erfolg für die Gaswechseluntersuchung von tierischen Gewebeschnitten benutzt hat.

Zu diesem Zwecke wurden sterile Gewebezylinder im bereits erwähnten Schneideapparat in kleine runde Schnitten vom 6 mm Durchschnitt und von beliebiger Dicke (meistens ½ oder 1 mm) zerlegt. Der Apparat wurde nach dem von STEWARD (1930) beschriebenen Muster konstruiert. Dieser Forscher schnitt Scheibchen von 34 mm Durchschnitt und 0.75 mm Dicke, die in seinen Salzabsorptions- und Atmungsversuchen angewandt wurden. Für die WARBURG-Apparatur wären diese Scheibchen jedoch zu gross gewesen und der Schneideapparat wurde daher für 6 mm-Schnitten entworfen. Die Ausführung war messingverchromt; der Bohrer zeigte bald Abnutzung der Chromschicht und wurde später aus rostfreiem Stahl hergestellt. Das Schneiden geschah mit einem Gillette-Rasiermesser und die Schnitten wurden in Leitungswasser aufgefangen. Aus einer normalen Knolle konnten leicht alle für eine Versuchsreihe benötigten Schnitten (420 von ½ mm oder 210 von 1 mm Dicke) erhalten werden.

Anfänglich wurden die Schnitten sofort nach dem Schneiden auf die Gefässe verteilt. Es erwies sich jedoch als wünschenswert die Schnitten vorher einige Zeit zu wässern (s. unten) und daher wurden die Scheibchen fernerhin am Tage vorher geschnitten und nachtsüber in strömendem Leitungswasser gespült.

Die Wässerung fand in einem Glasfilter statt, dessen Abflussrohr S-förmig nach oben gebogen und als Heber angeordnet war, damit das Niveau im Apparat konstant bleiben konnte. Ein dünner Wasserstrahl im Filter hielt die Schnitten in wirbelnder Bewegung und sorgte zugleich für die Durchlüftung. Im Winter wurde das Leitungswasser vorgewärmt, indem es durch ein Rohr über den Radiator der Zentralheizung geleitet wurde. Die Temperatur des Spülwassers fiel auf diese Weise nicht unter 9° C.

Am Morgen wurden die Schnitten in gleichen Mengen auf die Atmungströge verteilt, in denen sie in Phosphatpufferlösung suspendiert wurden. Diese Lösung war hergestellt aus einem Gemisch von $^1/_{15}$ m primärer Kalium- und $^1/_{15}$ m sekundärer Natriumphosphat-

lösung, nach SÖRENSEN. Gewöhnlich kam ein Puffergemisch mit einem pH-Wert von 6.2 zur Anwendung.

3. Pilzmaterial.

Vom Anfang der Versuche an wurde *Gibberella Saubinetii* (Mont.) Sacc. (= *Fusarium graminearum* Schwabe) als Impfmaterial zur Infektion vom Kartoffelgewebe und als Myzelquelle für die Herstellung von Extrakten verwendet.

Dieser Hyphenpilz, der als Erreger von Getreidekrankheiten bekannt geworden ist und bei orientierenden Versuchen zur Infektion von Maiskeimlingen benutzt wurde, kann auch, wie sich zufälligerweise zeigte, das Kartoffelknollengewebe befallen und darauf eine Fäulekrankheit, über die wir bereits berichteten, hervorrufen. Die künstliche Infektion gelang sehr leicht und der Pilz zeigt auch in Reinkultur ein schnelles Wachstum; aus diesen Gründen wurde der Pilz als Hauptobjekt gewählt.

Die Stammkulturen sind auf saurem Hafermalzagar gezogen, auf dem sich reichlich Konidien bildeten, die zur Impfung des Kartoffelgewebes und der RICHARDS-Nährlösung dienten. Diese Nährlösung ist wie folgt zusammengestellt:

KNO_3	10 g	
KH_2PO_4	5 g	
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2.5 g	pH (nach Autoklavieren): 4.1
$FeCl_3$	20 mg	
Glukose	50 g	
H_2O (dest.)	1000 cm^3	

Der Pilz zeigt in dünnen Schichten dieser Lösung in Erlenmeyer-Kolben (z.B. 40 cm^3 Flüssigkeit in 500 cm^3-Kolben), bei Zimmertemperatur und in diffusem Sonnenlicht ein gutes Wachstum. Die Myzeldecken wurden zur Herstellung von Extrakten verwendet und auch die filtrierte Kulturflüssigkeit kam in Atmungsversuchen mit Kartoffelgewebe zur Anwendung.

Ausserdem wurde eine Anzahl anderer Pilze zu gleichen Zwecken gezüchtet:

Fusarium oxysporum Schl. *f.* 1 Wr.
Fusarium coeruleum (Lib.) Sacc.
Fusarium trichothecioides Wr.
Fusarium bulbigenum Cke. et Mass. var. *lycopersici* (Brushi)Wr.
Rhizoctonia solani Kühn *graminis* Bunschoten.
Trichoderma lignorum (Tode) Harz.

Die drei erstgenannten Fusarien und *Rhizoctonia solani* treten als Parasiten der Kartoffelknolle auf; *Fusarium bulbigenum* var. *lyc.*

ist bekannt als Erreger der Welkekrankheit der Tomate und *Trichoderma lignorum* ist einer der allgemeinsten saprophytischen Bodenpilze.

Die Fusarien wurden auf der RICHARDS-Nährlösung gezogen, während *Rhizoctonia solani* und *Trichoderma lignorum* auf KNOPscher Nährlösung von folgender Zusammensetzung gezüchtet wurden:

$Ca(NO_3)_2$	1 g	
KH_2PO_4	0.25 g	
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0.25 g	pH (nach Autoklavieren): 5.5
KCl	0.12 g	
$FeCl_3$	eine Spur	
H_2O (dest.)	1000 cm^3	

der 5 g Zucker (Glukose) zugefügt wurde (KNOP-Zucker-Lösung). Die Kultur dieser Pilze erfolgte in diesem Nährmedium besser als in der zuckerreichen RICHARDS-Lösung.

Für einige Nebenversuche wurden überdies noch Reinkulturen von *Phycomyces Blakesleeanus* Burgeff und von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, „Rasse M" (Menghefe), des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin, verwendet.

Alle obengenannten Hyphen- und Sprosspilze stammen aus der Sammlung des „Centraalbureau voor Schimmelcultures" in Baarn.

4. Herstellung der Extrakte.

Um zu untersuchen ob vom Parasiten Stoffe gebildet werden, die auf die Atmung des Kartoffelgewebes einwirken, wurden aus dem Pilz in Reinkultur und aus dem Wirtspflanze-Parasit-Komplex Extrakte hergestellt.

a. *Myzelextrakt.* Die aus der Reinkultur gewonnenen Myzeldecken wurden auf einem Büchnertrichter gesammelt, mit destilliertem Wasser gewaschen um die Kulturflüssigkeit zu entfernen, und im Vakuum-Exsikkator über Calziumchlorid getrocknet. Vom Trockenmyzel wurde eine bestimmte Gewichtsmenge mit ausgeglühtem und gewaschenem Quarzsand im Mörser zu feinem Pulver zerrieben. Dieses Myzelpulver-Sand-Gemisch wurde bis zur Extraktion im Exsikkator aufbewahrt.

Dieses Verfahren hatte einen dreifachen Zweck. Erstens wurden ohne Erhitzung alle Lebensfunktionen und enzymatischen Vorgänge im Myzel eingestellt. Zweitens war das trockene Pulver vor bakterieller Zerlegung geschützt und schliesslich konnte das Wiegen vom Myzel in dieser Form leicht statt finden. Die Extraktion erfolgte mit destilliertem Wasser, Äthylalkohol oder einem anderen Lösungsmittel, in der Kälte (bei Zimmertemperatur) oder bei höheren Temperaturen im Wasserbad oder im Autoklav.

Der wässerige Extrakt bildete eine feine Suspension in der die gröberen Teilchen sich bald absetzten; die Flüssigkeit wurde jedoch auch nach dem Zentrifugieren nicht ganz klar und wies sodann eine rosa-gelbe Farbe auf.

Nach Extraktion mit Alkohol war die gewonnene Flüssigkeit dagegen ganz klar und orangefarbig, zeigte aber beim Eindämpfen und Lösen in dest. Wasser einen ölartigen rotfarbigen Rückstand, der wie ein unlösliches Häutchen zurückblieb. Die Pilzfarbstoffe hatten sich grösstenteils in dieser Fraktion angesammelt.

Die auf eine dieser Weisen vom Myzel hergestellten Auszüge werden fernerhin sämtlich bezeichnet als: *Extrakt* I.

b. *Kulturflüssigkeit.* Es gab die Möglichkeit, dass etwaige atmungsaktivierende Stoffe vom Pilz in der Nährlösung ausgeschieden wurden und sich also in der Kulturflüssigkeit vorfinden sollten. Daher wurde die Flüssigkeit, nachdem sie vom Myzel durch Filtration getrennt worden war, im Eisschrank aufbewahrt oder autoklaviert und nachher im Atmungsversuch auf ihre Wirkung geprüft. Bequemlichkeitshalber wird diese Flüssigkeit, die wie Extrakt I weiteren Bearbeitungen unterzogen wurde, als *Extrakt* II bezeichnet werden, obwohl die „Extraktion" bereits während der Kultur stattgefunden hatte.

c. *Extrakt vom infizierten Kartoffelgewebe.* Die geimpften und vom Pilz befallenen Gewebezylinder wurden nach einigen Tagen entweder als solche, oder nach Zerreiben mit Quarzsand, mit destilliertem Wasser oder Alkohol ausgezogen. Der Extrakt wurde zentrifugiert oder filtriert: *Extrakt* III.

In gleicher Weise wurden auch Extrakte hergestellt von nichtinfizierten Gewebezylindern, die aus derselben Knolle geschnitten worden waren, die also als Ausgangsmaterial den infizierten Zylindern gleich waren. Diese Flüssigkeiten dienten in Versuchen mit Extrakt III als Kontrolle.

Die wässerigen Extrakte konnten, nach kurzem Aufkochen zur Abtötung von möglich anwesenden Pilzsporen und Bakterien, sofort in Atmungsversuchen Anwendung finden; die mit anderen Lösungsmitteln hergestellten Extrakte nach Abdünstung und Lösung in destilliertem Wasser.

5. Sterilität.

Kartoffelknollenschnitten, wenn nicht äusserlich trocken und verkorkt, bilden ein geeignetes Substrat für saprophytische Mikroorganismen, besonders für Bakterien, die sich — dank der Anwesenheit von organischen Stoffen, welche aus den angeschnittenen Zellen und durch Exosmose vielleicht auch aus den lebenden Zellen stammen — schnell vermehren können.

Beim Wässern der Schnitten war dann auch eine der wichtigsten Absichten, diese Stoffe zu beseitigen, während andrerseits die gleichzeitige Durchlüftung verhinderte, dass das Gewebe einer anaeroben Beschädigung unterzogen und anaeroben Bakterien anheimfallen würde.

Obwohl keine vollständige Sterilität in den Versuchen angestrebt wurde, da dies zu zeitraubend und ausserdem nicht unbedingt notwendig war, wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die Schnitten nicht mit nichtsterilen Gegenständen oder Flüssigkeiten in Berührung kamen, damit Infektion mittels Bakterien so viel wie möglich vorgebeugt werden sollte. Praktisch käme nur Infektion aus der Luft oder aus dem übrigens nahezu sterilen Leitungswasser in Betracht. Alle zum Schneiden und Manipulieren verwendeten Instrumente wurden vorher in der Flamme sterilisiert, die Schnitten wurden in Leitungswasser in sterilen Schalen aufgefangen und übertragen in sterile Pufferlösungen in sorgfältig gereinigten und getrockneten Atmungsgefässen.

Der Spülapparat, in dem die Schnitten gewässert wurden und in dem sich allmählich Stärke ansammelte, wurde mit Bichromat-Schwefelsäure behandelt und mit 4 %igem Formalin vor der Verwendung desinfiziert. Die Atmungströge wurden nach Beendigung jedes Versuchs ausgespült und die Schliffe sorgfältig mittels Benzin von den Vaselinresten befreit. Nachtsüber verweilten die Gefässe in Bichromat-Schwefelsäure und vor dem Versuch wurden sie gründlich ausgespült, mit Alkohol nachgespült und bei 60° C. getrocknet.

Ähnliche Massnahmen bezogen sich auf die Extrakte: sie wurden im Eisschrank bei —1° C. aufbewahrt oder autoklaviert und kamen nur mit sterilem Glasgeschirr in Berührung.

Ausserdem wurden die Flüssigkeiten vor dem Versuch gewöhnlich kurz aufgekocht, falls sie nicht bereits steril waren. Die Vorbereitung einer Versuchsreihe dauerte etwa 2 Stunden. Der eigentliche Atmungsversuch wurde meistens nicht länger als 4 bis 5 Stunden fortgesetzt. Während dieser kurzen Versuchsdauer konnte, bei Beachtung der obengenannten Vorsichtsmassnahmen, praktisch keine störende Bakterien-Atmung auftreten. Diese Voraussetzung wurde wiederholt durch mikroskopische Kontrolle bestätigt und namentlich durch Atmungsversuche mit der Suspensionsflüssigkeit nach Beendigung der Versuchsreihe und nach Entfernung der Gewebeschnitten: die ermittelte Atmungsgrösse war immer zu vernachlässigen oder unmessbar klein.

Bei längerer Versuchsdauer trat allerdings schliesslich eine schnell zunehmende Bakterienentwicklung auf und, damit verknüpft, eine

steile Steigung der Atmungskurve. Auf diese Bakterienatmung kommen wir später, bei der Besprechung der Versuchsresultate, noch zurück.

Der Gesundheitszustand der Kartoffelschnitten konnte überdies noch demonstriert werden durch die aufrechterhaltene Turgeszenz des Gewebes am Ende des Versuchs.

6. Versuchsanordnung und Darstellungsweise der Resultate.

Nachdem die Einsätze der Versuchströge mit 0.4 oder 0.6 cm^3 25 % iger Lauge, die Haupträume mit 2 cm^3 Phosphatpufferlösung und 60 oder 30 Schnitten, und die Birnen mit einer bestimmten Menge Extrakt oder Kontrolleflüssigkeit gefüllt worden waren, wurden die Gefässe an die Manometerschliffe befestigt und die Manometer auf die Schüttelvorrichtung angebracht.

Das Wasser des Thermostaten, in dem die Tröge eingetaucht waren, wurde durch die Rührvorrichtung in ständiger Zirkulation gehalten.

Eine halbe Stunde wurde mit offenen Hähnen geschüttelt bis zum Temperaturausgleich. Die Hähne wurden darauf geschlossen und die Manometer abgelesen; während einer Stunde wurde dann geschüttelt. Nachdem von neuem der Stand abgelesen worden war, wurden die Flüssigkeiten in den Birnen schnellstens der Suspensionsflüssigkeit und den Gewebeschnitten zugefügt, indem wir die Gefässe kippten. Sodann wurde stündlich abgelesen.

Wenn die Birnen nur 0.3 cm^3 Flüssigkeit enthielten, war es auch bei der Schüttelgeschwindigkeit von 280 Schwingungen die Minute ausgeschlossen, dass vorzeitig ein Teil der Flüssigkeit in den Hauptraum geriet. Anfänglich wurden die Birnen mit grösseren Mengen (z.B. 0.6 cm^3) gefüllt. Die Füllung hätte daher sicherheitshalber erst nach der ersten Versuchsstunde statt zu finden, worauf nach erneutem Temperaturausgleich sofort das Kippen erfolgte.

Nach Beendigung jedes Versuchs wurde der pH-Wert der Suspensionsflüssigkeit mit Hilfe eines HELLIGE-Mikrokomparators kontrolliert.

Die beobachteten Druckveränderungen ergaben in der üblichen Versuchsanordnung, nach Umrechnung mit den Gefässkonstanten, die Volumänderungen und somit die verschwundene Sauerstoffmenge. In der Regel wurde nur diese bestimmt und später zeigen wir, dass die Sauerstoffaufnahme in den meisten Fällen tatsächlich als „Atmung" bezeichnet werden darf.

In den sieben Gefässen einer Versuchsreihe, je eine gleiche Anzahl aus einer Knolle gewonnener Gewebeschnitten enthaltend, waren die Atmungsbedingungen in der ersten Stunde gleich und tatsächlich

wurden innerhalb einer ziemlich engen Variationsbreite in der Regel durchaus vergleichbare Atmungsgrössen beobachtet. Wenn die Variationen wegen der kleinen Anzahl der Gefässe und der Gewebeschnitten auch nicht immer regelmässig waren, der mittlere Fehler stellte sich jedoch gewöhnlich auf etwa 1 %.

Für die meisten Versuchsreihen hatten diese Variationen allerdings keine grosse Bedeutung, da jedes Gefäss einen gesonderten Versuch bildete und nicht die Atmungsgrössen der einzelnen Gefässe gegenseitig verglichen wurden, sondern für jedes Gefäss die Atmung in der ersten Stunde als Grundlage diente, auf der die Atmungsgrösse in den folgenden Stunden (also nach dem Kippen und der Einwirkung der zugefügten Flüssigkeit) berechnet werden konnte.

Dennoch wurde eine möglichst einheitliche Atmungsgrösse in allen Gefässen angestrebt, damit die Wirkungen von gleichen Mengen Extrakt in den verschiedenen Gefässen zu vergleichen waren.

Für die Bestimmung des respiratorischen Quotienten wurde ausserdem, wie bereits erwähnt, vorausgesetzt, dass die Atmungsgrössen in den drei jeweils benötigten Gefässen genau gleich sein sollten. Die Variationsschwankungen beeinträchtigen also die Genauigkeit des gefundenen R.Q, aber andrerseits beschränken die verhältnismässig geringen Variationen diesen Fehler.

In den Tabellen wird immer die absolute Grösse der Atmung in der ersten Versuchsstunde (in mm^3 O_2 pro 30 oder 60 Schnitten von je 1 oder ½ mm Dicke) erwähnt, während für die folgenden Stunden nur die relative, auf die erste Stunde bezogene Atmungsgrösse, in Prozenten angegeben wird. Ohne nähere Angabe erfolgte das Auskippen des Birneninhalts immer sofort nach der ersten Stunde.

Die grafischen Darstellungen, die meistens nur die relativen Atmungskurven zeigen, verzeichnen nicht den genauen Verlauf der Atmungsintensität während des Versuchs, sondern die Linien verbinden Punkte, welche die Atmungsgrössen in den aufeinanderfolgenden Stunden anzeigen. Ein starkes Steigen der Atmung in der zweiten Stunde verursacht also eine steil-auflaufende Kurve. Das bedeutet jedoch nicht, dass die Atmung geradlinig gestiegen sei und dass die Erhöhung sofort nach der Hinzufügung des Extrakts begonnen habe.

Eine andere grafische Darstellungsweise, z.B. mit Rechtecken, deren Höhe massgebend sein soll für die Atmungsgrösse, wäre richtiger, ist aber bei Vergleichung von mehreren Kurven in einer Figur weniger übersichtlich.

ABSCHNITT III.

DIE ATMUNG DES KARTOFFELKNOLLENGEWEBES UND DER EINFLUSS EINIGER VERSUCHSBEDINGUNGEN.

1. Literaturbesprechung.

Eine Literatur-Übersicht über die Atmung vom Kartoffelknollengewebe wird gegeben von STEWARD, WRIGHT u. BERRY (1932). Die Gebundenheit der Atmung an die Anwesenheit von freiem Sauerstoff gelangt darin besonders zum Ausdruck; das Gewebe atmet aerob, mit einem R.Q. = 1, und erst nachdem aller Sauerstoff verschwunden ist, tritt anaerobe Gärung auf (NOVY, 1925). Ausserdem hat man festgestellt, dass beim Durchschneiden der Knolle eine erhöhte Atmung einsetzt, die zurückgeführt werden muss auf den leichteren Eintritt des Sauerstoffs, also nicht auf eine von einem „Wundreiz" ausgelöste Wundatmung, denn nach Wiedervereinigung der geschnittenen Teile und nach Versiegelung der Wunde mit Tonerde verschwand die Atmungserhöhung (RICHARDS, 1896). Eine andere „Wundreaktion" ist die hydrolytische Spaltung von Stärke in Zucker in den Zellen unter der Schnittfläche (HOPKINS, 1927). Weiter sollte die Verwundung und die Aussetzung des Gewebes an die Luft mit einer Synthese von Proteinen zusammen gehen.

Die Erscheinungen von „black heart" (schwarzes Herz) in Kartoffelknollen, die infolge ungenügender Durchlüftung oder einer zu hohen Temperatur (bei stockendem Sauerstoffzutritt) im Lager auftreten, deuten auch auf eine vom freien Sauerstoff abhängige Kartoffelatmung (HEALD, 1933).

Die limitierende Wirkung des Sauerstoffzutritts (oder der Kohlensäureabfuhr) auf die Atmung, wie diese aus der erhöhten Atmung an der Schnittfläche bei durchschnittenen Knollen hervortritt, veranlasste STEWARD zu untersuchen, wie tief sich die Zone dieser Wirkung erstreckt und in welchem Masse die Atmungsintensität in diesen Zellen durch einen besseren Sauerstoffzutritt gesteigert wird. Dünnere Gewebescheibchen (also mit einer relativ grossen Oberfläche) zeigten pro Volumeneinheit eine höhere Atmung als dickere und die Atmungsgrössen bei verschiedenen Oberfläche/Volumen-Verhältnissen wurden festgestellt. Die mathematische Ausarbeitung dieses Oberfläche/Volumen-Effekts (STEWARD, 1933) ergab, dass für die inneren Zellen, in denen die Sauerstoffzufuhr die Atmung limitierte, eine Kohlensäureabgabe von etwa 0.01 mg pro Gramm/Stunde festgestellt werden konnte, während die Atmung der dünnsten Schnitten einen Maximalwert von 0.38 mg

CO_2 erreichen könnte. Das ist also die Atmungsintensität der äussersten Zellschicht und man muss sich denken, dass die Kurve, welche die Atmungsgrösse der verschiedenen Zellschichten darstellt, jäh abfällt, bis auf einer Tiefe von 0.4—0.5 mm, d.h. etwa bei der 4ten Zellschicht, die obenerwähnte „basale" Atmungsgrösse von 0.01 mg CO_2 erreicht wird. Zur Vermeidung einer „inaktiven" zentralen Gewebezone benutzte STEWARD Schnitten von 0.75 mm Dicke. Diese Angaben beziehen sich auf Scheibchen, die bei einer Versuchstemperatur von 23.2° C. in durchlüftetem Wasser schwebten. Bei mikroskopischer Untersuchung zeigten sie nur wenige Zellteilungen, aber das Verschwinden von Stärke aus den 2 äussersten Zellschichten konnte festgestellt werden.

In Schnitten, die der Luft ausgesetzt waren, gab es eine tiefere Zone (etwa 1.4 mm tief) mit erhöhter Atmung und dementsprechend ein Verschwinden der Stärke in 6 oder 7 Zellschichten. In diesem Falle entwickelte sich schnell ein Kork-Kambium in den äussersten Schichten.

Die Änderungen der Sauerstoffzufuhr im Gewebe, die dadurch verursacht wurden, dass eine andere Dicke oder Zahl der Schnitten genommen wurde, führten immer eine gleichzeitige Änderung der Kohlensäure-Entwicklung herbei, was auf eine streng aerobe Atmung des Kartoffelgewebes hinweist.

Die STEWARDsche Atmungsmethodik (CO_2-Absorption in Reiset-Röhren) weicht jedoch zu viel von der in vorliegender Arbeit benutzten WARBURGschen Methode ab, um weitere Vergleichung zu gestatten.

Gleichzeitig mit dem Verfasser haben auch BOSWELL u. WHITING (1938) die Scheibchenmethode auf die WARBURGsche Atmungsapparatur übertragen und sie machten, was die Technik anbelangt, vielfach dieselbe Erfahrung. Sie arbeiteten mit Kartoffelknollengewebe, und auch mit Möhren- und Kohlrübengewebe und verwendeten Schnitten von etwa 0.75 mm, d.h. etwa 4 Zellschichten Dicke (bei einer Dicke von 1 mm sollte bereits eine „inaktive" Zone auftreten), die in fliessendem, durchlüftetem Leitungswasser längere Zeit (etwa 2 Tage) gespült wurden. Nicht-gewässertes Gewebe zeigte einen sehr variabelen R.Q. zwischen 0.7 und 0.8, während beim Spülen eine Steigung des R.Q. auftrat, bis derselbe nach 4 Stunden Spülen nahe an 1.0 lag und wenig variierte. Diese Versuche wurden bei einer Temperatur von 31° C angestellt, die nach NOVY (1925) optimal für das Kartoffelknollengewebe ist. Was die Suspensionsflüssigkeit anbelangt zeigte es sich, dass ein Azetatpuffer dem Phosphatpuffer gegenüber einen Depressoreffekt ergab, so dass das Phosphatgemisch gewählt wurde. Der Einfluss der Konzentration der Pufferlösung (zwischen 0.067 und 0.003 m) auf die Atmung war

gering. Im pH-Bereich von 5.29 bis zu 6.81 blieb die Atmungsgrösse nahezu konstant, um bei höherem pH-Wert etwas an zu steigen. Diese Forscher wählten eine Pufferlösung von pH 5.5, wegen des Vorteils dieses pH-Wertes beim Bestimmen der CO_2-Abgabe und des R.Q.

Andere, die das Kartoffelknollengewebe in Atmungsversuchen mit der manometrischen Methode (abgeänderte WARBURGsche Apparatur) zur Anwendung brachten, waren LEMMON (1936) und PRATT u. WILLIAMS (1939), die jedoch keine Scheibchen, sondern kleine Gewebezylinder nahmen, mit einer respektiven Länge von 11½ und 10 mm und einem Durchschnitt von 6 und 4 mm. Die Versuchstemperatur war 30° C und die Knollen wurden vorher 24 Stunden auf dieser Temperatur gehalten.

LEMMON studierte den Einfluss des pH-Wertes der Suspensionsflüssigkeit auf die Atmung mit Hilfe von Pufferlösungen, die verschiedene pH-Gebiete umfassten. Durch Salz-Effekte fielen die Atmungsgrössen dort, wo die pH-Strecken der verschiedenen Puffer einander überdeckten, nicht ganz zusammen. Übrigens waren die Kurven ziemlich flach und aus Mittelwerten von ziemlich auseinanderlaufenden Beobachtungen zusammengestellt. Aus diesen Gründen kann den erzielten Optima nur geringer absoluter Wert beigemessen werden. Das Optimum in den ersten zwei Stunden lag bei pH 5.5, aber verschob sich nach Fortsetzung des Versuchs zu einem niedrigerem Wert. Die beobachteten Atmungsgrössen variierten zwischen 20 und 50 mm^3 O_2 pro 2 g Frischgewicht/Stunde.

PRATT u. WILLIAMS bedienten sich eines Phosphatpuffers von 0.1 m und pH 5.3.

Die Bedenken gegen Atmungsversuche mit Gewebezylindern liegen in der Anwesenheit der obenerwähnten „inaktiven" Zone mit ihrer äusserst limitierten „basalen" Atmung. In einem solchen Falle ist es schwierig, mit Gewissheit fest zu stellen, ob eine Änderung der Atmungsgrösse der Zylinder verursacht wäre von einer Änderung in allen Zellen oder von einer Änderung in der Zahl der „aktiv" atmenden Zellschichten, also von einer Änderung der Gasdiffusionsgeschwindigkeit (WARBURG, s. VAN RAALTE, 1937). Aus diesen Gründen ist denn auch den Versuchen mit Gewebezylindern, insofern sie in dieser Arbeit erwähnt werden, nur orientierender Wert beizumessen. Lediglich bei Verwendung von dünnen Gewebescheibchen darf eine Atmungserhöhung mit Gewissheit einer höheren Stoffwechselaktivität der Zellen zugeschrieben werden.

Atmungsversuche, mit pflanzlichem Gewebe anderen Ursprungs, aber ebenso mit der manometrischen Methode ausgeführt, und bei Anwendung dünner Gewebeschnitten, sind unternommen worden

von CALDWELL u. MEIKLEJOHN (1937) mit Tomatenstengelgewebe und von TURNER (1938) mit Möhrengewebe.

Namentlich die Erfahrungen von TURNER, der den respiratorischen Stoffwechsel vom Lagergewebe der Möhre studierte, erlauben Vergleichung mit der vorliegenden Arbeit, was die Versuchsbedingungen wie z.B. die Dicke und die Vorbehandlung der Gewebescheibchen betrifft. Er nahm 15 Schnitten von 1 mm Dicke und 8 mm Durchschnitt pro Gefäss, die vorher längere Zeit in fliessendem Leitungswasser gewässert wurden. Die Atmung in Luft und in reinem Sauerstoff stieg langsam während der Versuchsdauer von 4 bis 5 Stunden.

2. Der Einfluss einiger methodischer Faktoren auf die Atmung.

Die Atmungsintensität von Kartoffelschnitten ist nicht nur von den üblichen kontrollierbaren Umweltfaktoren abhängig, wie Temperatur und partieller Sauerstoffdruck, sondern im vorliegenden Falle auch von Versuchsbedingungen, wie Dimensionen und Zahl der Schnitten, Schüttelgeschwindigkeit (die allerdings sämtlich mit der Sauerstoffzufuhr verknüpft sind), sowie Natur und Wasserstoffionenkonzentration der Suspensionsflüssigkeit und Vorbehandlung des Gewebes.

Es soll immer beabsichtigt werden, die Bedingungen so zu wählen, dass die Atmung einen optimalen Wert erreiche, damit eine limitierende Wirkung einer dieser Faktoren nicht mehr vorliege. Die praktische Ausführung beschränkt jedoch oft diese theoretischen Anforderungen und so wurde im vorliegenden Falle eine Versuchstemperatur von 25° C der optimalen Temperatur (31° nach NOVY, 1925) vorgezogen, mit Rücksicht auf die gleichfalls günstigen Bedingungen der Bakterienentwicklung bei der höheren Temperatur.

Der Einfluss einiger Faktoren wurde vor allem auch im Zusammenhang mit dem Effekt geprüft, den die Extrakte auf die Atmung ausübten und dieser kommt daher bei der Besprechung der Versuche zur Sprache.

a. Die Dimensionen der Schnitten. Der Durchmesser von 6 mm wurde gewählt in Hinsicht auf die bequeme Übertragung der Scheibchen in die Gefässe.

Anfänglich wurden Schnitten von ½ mm Dicke verwendet, um auf jeden Fall die „inaktive" Zone (STEWARD) zu vermeiden. Nachher gelangten, zur Vereinfachung der Technik, Scheibchen von 1 mm Dicke zur Anwendung, deren Atmung pro Volumeneinheit, wie sich zeigte, nicht niedriger war.

TABELLE 1.

Versuch: 16-9-38.
Hauptraum: Schnitten aus einer „Eigenheimer" Knolle, in Puffern von verschiedenen pH.
Birne: leer.
Einsatz: 0.6 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.

Gefäss Nr.	Schnittenzahl	Susp. Fl. pH	verbrauchter Sauerstoff					
			mm^3/ Stunde	in Prozenten d. 1sten Stunde				
			1. St.	2.	3.	4.	5.	6. St.
1	60 von ½ mm	5.5	75.4	100	107	120	119	132
2	60 von ½ mm	6.2	67.6	101	107	114	117	133
3	60 von ½ mm	6.8	76.5	98	104	109	109	120
4	30 von 1 mm	5.5	74.6	102	108	117	119	131
5	30 von 1 mm	6.2	75.0	104	110	123	127	141
6	30 von 1 mm	6.8	81.9	102	107	116	120	133
7	15 von 2 mm	6.2	66.6	112	121	133	135	149

Die *Tabelle 1* ergibt, dass die Atmung von 30 Schnitten von 1 mm eher etwas höher war, als die von 60 Schnitten von ½ mm Dicke. Diese Tatsache ist erklärlich, wenn man berücksichtigt, dass einerseits (nach STEWARD) bei der Dicke von 1 mm kaum noch eine „inaktive" Zone auftritt, während andrerseits ein Scheibchen von 1 mm wenigstens eine unverletzte Zellschicht mehr hat als 2 Scheibchen von ½ mm, was auf etwa 7 Zellschichten pro mm die Anwesenheit von mindestens 15% lebenden Gewebes mehr bedeutet.

Bei 2 mm Dicke wird jedoch die Atmung pro Volumeneinheit infolge des Auftretens einer „inaktiven" Gewebezone, dem STEWARDschen Oberfläche/Volumen-Effekt entsprechend, wieder niedriger.

b. Die Zahl der Schnitten. Die Zahl der Schnitten pro Gefäss wurde limitiert, einerseits, von der Anforderung, dass die Atmungsgrösse pro Stunde im Verhältnis zum Ablesungsfehler genügend gross sein sollte, andrerseits vom Raum im Gefäss, in dem die Scheibchen, zur Erzielung einer guten Durchlüftung beim Schütteln, frei von einander in der Suspensionsflüssigkeit schweben sollten. Die gewählten Zahlen (60 × ½ mm oder 30 × 1 mm) kamen diesen beiden Forderungen entgegen.

c. Die Natur der Suspensionsflüssigkeit. Aus einigen Versuchen stellte sich heraus, dass die Phosphatpufferlösung ($^1/_{15}$ m) keinen herabdrückenden Effekt auf die Atmung ausübte.

TABELLE 2.

1. Versuch: 3-10-38.
Hauptraum: 60 Schnitten von ½ mm „Eigenheimer" in versch. Susp. Flüssigkeiten.
Birne: leer.
Einsatz: 0.6 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert (48 Stunden).

Gefäss Nr.	Suspensions-Flüssigkeit	verbrauchter Sauerstoff		
		mm^3/Stunde	in Prozenten d. 1sten St.	
		1. Stunde	2.	3. Stunde
1	dest. Wasser	65.8	109	114
2	Leitungswasser	70.4	110	109
3	Phosphatpuffer, pH 6.2	72.8	118	114

2. Versuch: 2-12-38.
Hauptraum: 30 Schnitten von 1 mm „Eigenheimer" in dest. Wasser oder Puffer.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.

Gefäss Nr.	Suspensions-Flüssigkeit	verbrauchter Sauerstoff in der 1sten St. mm^3/Stunde	
1	dest. Wasser	44.7	durchschn. 43.5
2	„ „	43.1	
3	„ „	42.6	
4	Phosphatpuffer, pH 6.2	49.3	durchschn. 51.7
5	„	52.6	
6	„	52.1	
7	„	52.8	

Aus *Tabelle 2* geht hervor, dass die Atmungsintensität in der Pufferlösung im Gegenteil eine Erhöhung erfuhr, im Vergleich mit der Atmung in destilliertem Wasser oder in Leitungswasser. Im übrigen verlief sie parallel mit jener. Ein kleiner Unterschied der pH-Werte dieser Flüssigkeiten soll hierbei jedoch in Betracht gezogen werden.

Dieser Atmungseffekt kann vielleicht mit der interessanten Beobachtung von STEWARD, STOUT u. PRESTON (1940) verbunden werden, dass verdünnte Lösungen von KCl und KNO_3 eine erhebliche Atmungssteigerung vom Kartoffelgewebe herbeiführen könnten. Hiernach soll zwischen der Salzaufnahme und der Atmung ein Zusammenhang bestehen. Die Versuchsanordnung dieser Forscher — und namentlich die Versuchsdauer (70 Stunden) — ist jedoch

ganz verschieden von der in vorliegender Arbeit, so dass bei Vergleichung der Resultate Vorsicht beachtet werden muss.

d. *Der pH-Wert der Suspensionsflüssigkeit. Tabelle 1* demonstriert gleichzeitig die Tatsache, dass im Gebiet von pH 5.5 bis 6.8 das pH auf die Intensität und den Verlauf der Atmung nur geringen Einfluss hat. Bei höheren pH-Werten liegt die Sache anders. *Tabelle 3*

TABELLE 3.

1. Versuch: 12-5-38.
Hauptraum: 60 Schnitten von ½ mm, „Bintje", in Puffern von verschiedenen pH.
Birne: leer.
Einsatz: 0.6 cm^3 KOH 5 %.
Frisch-geschnittenes Gewebe.

Gefäss Nr.	pH Susp. Flüssigkeit	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/Stunde	in Prozenten d. 1sten Stunde		
		1. Stunde	2.	3.	4. Stunde
1	8.1	30.6	101	97	78
2	7.35	38.7	93	96	83
3	6.85	41.5	98	113	119
4	6.2	36.5	106	109	112
5	5.6	35.0	100	102	113

2. Versuch: 19-7-38.
Hauptraum: 60 Schnitten von ½ mm, „Muizen", in Puffern von verschiedenen pH.
Birne: leer.
Einsatz: 0.6 cm^3 KOH 25 %.
Frisch-geschnittenes Gewebe.

Gefäss Nr.	pH Susp. Flüssigkeit	verbrauchter Sauerstoff		
		mm^3/Stunde	in Prozenten d. 1sten St.	
		1. Stunde	2.	3. Stunde
1	7.7	33.6	108	84
2	6.8	35.7	100	82
3	6.2	38.2	127	146
4	5.5	40.2	128	157

(s.auch *Tabelle 6*) fasst einige Versuchen zusammen, aus denen sich ergibt, dass die Atmungsgrösse bei höherem pH (z.B. 8.1) niedriger ist und bald weiter abfällt, während in niedrigerem pH-Gebiet die Atmung im Laufe des Versuchs in einer fortwährenden Steigung begriffen ist. Bei pH-Werten über 7.0 tritt offenbar eine schädliche Wirkung auf. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit dem Befund

von BOSWELL u. WHITING (s. oben), die bei hohen pH-Werten eine etwas erhöhte Atmung erzielten. Für die normalen Versuche wurde eine Pufferlösung mit pH 6.2 gewählt, in der die Atmung im allgemeinen einen ziemlich langsam ansteigenden Verlauf hatte (bei niedrigerem pH wurde meistens ein steilerer Verlauf festgestellt).

e. *Die Schüttelgeschwindigkeit.* Versuche mit verschiedenen partiellen Sauerstoffdrucken sind nicht angestellt worden, weil, wie sich bald herausstellte, der Sauerstoffversorgung des Gewebes in erster Instanz keine limitierende Wirkung zugeschrieben werden dürfte. Wurde anfänglich gemeint, dass bei 280 Rotationen pro Minute die Durchlüftung des Gewebes am günstigsten war, nachher wurde festgestellt (*Tabelle 4*), dass auch eine Geschwindigkeit von

TABELLE 4.

Versuch: 6-3-39.
Hauptraum: 30 Schnitten von 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: leer.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Frisch-geschnittenes Gewebe, 1 Stunde gewässert.

Versuchsstunden	Schüttelgeschw.	verbrauchter Sauerstoff in 7 Gefässen durchschn.
1ste Stunde	280 p. Minute	31.2 ± 0.8 mm^3/Stunde
2te „	220 „	33.6 ± 0.4 „
3te „	280 „	35.2 ± 0.75 „
4te „	220 „	36.3 ± 0.4 „

220 × genügte. Zugleich zeigte es sich, dass der mittlere Fehler bei Vergleichung der Atmung gleicher Mengen Substanz in den verschiedenen Gefässen bei der niedrigeren Schüttelgeschwindigkeit kleiner war. Ausserdem wurde die Apparatur geschont.

f. *Die Vorbehandlung des Kartoffelgewebes.* Es stellte sich heraus, dass die Temperatur-Vorbehandlung und das Wässern der Schnitten einen bedeutenden Einfluss auf die Grösse, den Verlauf und die Reaktionsfähigkeit der Atmung ausübten. In allen Versuchen zeigte die Atmung, auch ohne jeden Zusatz, einen mehr oder weniger steigenden Verlauf (ausgenommen bei hohem pH-Wert der Suspensionsflüssigkeit).

Um den Einfluss zugefügter Stoffe einwandfrei aufweisen zu können, wäre es erwünscht von einer möglichst konstanten Atmungsintensität auszugehen. Als einmal festgestellt worden war, dass die Steigung, wenigstens in den ersten Stunden, nicht die Folge einer Bakterienatmung war, wurde untersucht, von welchen Faktoren dieser Verlauf beeinflusst werden könnte. Von vornherein war es

nicht befremdlich, dass die Atmung des Gewebes, das plötzlich auf höhere Temperatur gebracht und nach Zerlegung in dünne Schnitten für den Sauerstoff besser zugänglich wurde, nicht sofort durch eine schnelle Wiederherstellung des Gleichgewichts ein neues konstantes Niveau erreichte.

Man kann sich denken, dass z.B. bei höherer Temperatur die hydrolytische Spaltung von Stärke (oder eine andere katalytische Spaltung vom Atmungssubstrat) mit dem beschleunigten Tempo des Redoxenzymsystems keinen Schritt halten könnte. Oder dass die plötzliche Steigerung der Sauerstoffspannung im Gewebe nach dem Schneiden der Schnitten nicht eine gleich schnelle Steigerung des O_2-Verbrauchs herbeiführte, weil allerlei Hemmungsfaktoren, wie z.B. Plasmareste, Permeabilitätserniedrigung, anwesend sein könnten.

Auf zwei Wegen wurde versucht die Atmung zu grösserer Konstanz zu bringen, einmal dadurch, dass die Schnitten während der Nacht im Eisschrank einer Temp. von —1° C. ausgesetzt wurden und zweitens durch das Wässern der Schnitten. Das erste Verfahren beabsichtigte eine Steigerung der Zuckerkonzentration in der Zelle (HOPKINS, 1924), damit keine Stockung in diesem Teil der Substratzufuhr auftreten konnte. Das Wässern der Schnitten diente zunächst zur Stabilisierung der „Wundreaktion" und zur Ausspülung der angeschnittenen Zellen. Die Durchlüftung, die der Wasserstrahl herbeiführte, erhöhte die Sauerstoffspannung im Gewebe, so dass nicht nur eine für Bakterienentwicklung günstige anaerobe Beschädigung umgangen wurde, sondern auch der Atmungsmechanismus bereits vor dem Anfang des Versuchs sich der erhöhten Sauerstoffzufuhr „anpassen" konnte.

Aus *Tabelle 5* geht hervor, dass die Vorbehandlung im Eisschrank nicht den erwünschten Erfolg hatte: die Atmung fängt auf niedrigem Niveau an, genau wie bei den frischgeschnittenen Scheibchen, und steigt ziemlich schnell. In einigen Fällen wurde nach einiger Zeit eine sich ziemlich konstant erhaltende Atmung beobachtet, aber die Bedingungen, unter denen ein solcher Vorgang statt fand, sind nicht weiter ermittelt worden.

Grösseren Erfolg hatte das Wässerungsverfahren. Im Vergleich zu der Atmung der im Eisschrank vorbehandelten und der frisch-geschnittenen Scheibchen befand sich die Atmung der gespülten Scheibchen bereits am Anfang des Versuchs auf einem bedeutend höheren Niveau, währenddessen die Steigerung im Verlauf des Versuchs prozentweise geringer war.

Ausserdem zeigten die gespülten Schnitten der Extraktwirkung gegenüber ein höheres Reaktionsvermögen. Aus diesen Gründen wurde meistens diese Vorbehandlungsweise angewandt. In der

TABELLE 5.

1. Versuch: 13-9-38.
Hauptraum: 60 Schn. von ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 5. 5).
Birne: leer.
Einsatz: 0.6 cm^3 KOH 25 %.

Gefäss Nr.	Vorbehandlung der Schnitten	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/ Stunde	in Prozenten d. isten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	Frisch-geschnitten	34.7	123	141	150	146
2	„	34.7	132	163	179	184
3	Eine Nacht im Eisschrank	31.8	127	139	146	142
4	„ „ „ „	33.7	134	159	167	165
5	Eine Nacht gewässert	79.7	111	113	120	129
6	„ „ „	87.0	110	114	118	129

2. Versuch: 23-9-38.
Hauptraum: 60 Schn. von ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: dest. Wasser.
Einsatz: 0.6 cm^3 KOH 25 %.

Gefäss Nr.	Vorbehandlung der Schnitten	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/ Stunde	in Prozenten d. isten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	Frisch-geschnitten	43.4	91	122	139	151
2	Eine Nacht gewässert	80.2	103	106	115	120

Regel dauerte das Wässern eine Nacht, d.h. etwa 18 Stunden. Ausnahmsweise wurde während eines längeren Zeitabschnitts gespült, durch den nicht nur keine Beschädigung auftrat, sondern das Atmungsniveau sich noch höher und konstanter gestaltete.

STEWARD (1932) sowohl, wie TURNER (1938) und BOSWELL u. WHITING (1938) wendeten eine längere Wässerungszeit an. Aus ihren Versuchen geht hervor, dass nach einer anfänglichen Steigung die Atmung der Schnitten schliesslich an aufeinanderfolgenden Tagen auf nahezu konstantem Niveau anfing. Im Laufe des Tagesversuchs wies die Atmung allerdings eine langsame Steigung auf.

Eine schnelle Steigung der Atmungsgrösse — z.B. in 3 Stunden bis zu 50 % über dem Anfangswert — sollte nach BOSWELL u. WHITING eine starke Bakterien-Infektion nachweisen. Hierzu sei in

Erinnerung gebracht, dass diese Forscher bei einer Versuchstemperatur von 31° C. arbeiteten. Wie bereits obenerwähnt, konnte in eigenen Versuchen wiederholt festgestellt werden — dadurch, dass die Suspensions-Flüssigkeit am Ende des Versuchs keine oder nur eine geringfügige Atmung aufwies — dass Bakterien in den ersten Stunden keine bedeutende Rolle spielten. Bei Beachtung der erwähnten Vorsichtsmassnahmen darf die Steigung des O_2-Verbrauchs denn auch nicht einer Bakterienatmung zugeschrieben werden.

Wenn auch keine völlig konstante Atmungsgrösse erzielt wurde, so hielt das Wässern der Schnitten die Steigung in geeigneten Schranken, so dass diese bei der Bestimmung etwaiger Abänderungen der Atmungsintensität nicht sehr störte. Es wäre möglich, dass eine noch grössere Konstanz erreicht werden könnte, wenn die Vorbehandlung bei der Versuchstemperatur (25° C.) geschah. Der günstige Effekt der beschriebenen einfachen Spülmethode genügte jedoch und weitere Bemühungen wurden daher in dieser Hinsicht nicht unternommen.

3. Die Atmungsgrösse in verschiedenen Teilen der Knolle.

Um fest zu stellen wie am besten gleichmässige Teile aus einer Knolle geschnitten werden könnten, wurden mit Schnitten aus verschiedenen Teilen der Knolle einige Atmungsversuche angestellt.

a. *Vergleichung der basalen und apikalen Teile.* Hierzu wurden Scheibchen aus Gewebezylindern geschnitten, die nebeneinander senkrecht auf der morphologischen Längenachse der Knolle ausgebohrt worden waren. Die Scheibchen im Gefäss Nr. 1 (s. *Tabelle 6*)

TABELLE 6.

Versuch: 13-7-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Muizen", in Phosphatpuffer (pH 6.8).
Birne: leer.
Einsatz: 0.6 cm³ KOH 25 %.
Frisch-geschnittenes Gewebe.

Gefäss Nr.	Ursprüngliche Lage des Gewebes	verbrauchter Sauerstoff				
		mm³/Stunde	in Prozenten der 1sten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	Basaler Knollenteil	56.6	105	109	118	
2	│	43.7	94	87	84	67
3	│	49.5	91	79	79	63
4	│	50.4	86	65	60	46
5	│	44.2	86	67	59	50
6	↓	50.9	90	67	60	50
7	Apikaler Knollenteil	55.4	83	60	54	49

vertreten das am meisten basal liegende Gewebe, die im Gefäss Nr. 7 das am meisten apikal liegende Gewebe und die Schnitten in den zwischenliegenden Gefässen entsprechen den intermediären Knollenteilen. Die Scheibchen waren in diesem Falle suspendiert in Pufferlösung mit pH 6.8 und nicht gewässert. Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Atmungsgrösse in der ersten Stunde in allen Teilen ungefähr gleich war (die Streuung ist zwar ziemlich gross) und während des Versuchs abfällt, ausgenommen im Gefäss Nr. 1. Dieser Rückgang steht im Zusammenhang mit dem hohen pH (s. oben) und ist am meisten ausgeprägt im apikalen Teil der Knolle. Der abweichende Verlauf im Gefäss Nr. 1, also im basalen Knollenteil, weist dieser pH-Wirkung gegenüber auf eine andere Empfindlichkeit der Atmung hin.

b. *Vergleichung vom Gewebe innerhalb und ausserhalb des Gefässbündelringes.* Die in diesem Versuch verwendeten Gewebezylinder wurden, wie üblich, parallel an der Längenachse der Knolle ausgebohrt. Die Schnitten in den Gefässen Nr. 1 u. 2 (*Tabelle 7*) stammen

TABELLE 7.

Versuch: 19-1-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer", in Phosph.puffer (pH 6.2).
Birne: dest. Wasser.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.

Gefäss Nr.	Ursprüngliche Lage des Gewebes	verbrauchter Sauerstoff		
		mm^3/Stunde	in Proz. d. 1sten Stunde	
		1. St.	2.	3. Stunde
1	Markgewebe	75.6	108	125
2	„	70.5	—	—
3	Innerhalb d. Gefässbündelringes	71.8	112	128
4	„ „ „	73.8	—	—
5	„ „ „	76.0	109	126
6	Ausserhalb d. Gefässbündelringes	103.8	—	—
7	„ „ „	107.0	112	119

vom zentralgelegenen Gewebe, grösstenteils bestehend aus dem ursprünglichen Markgewebe des Ausläufers (ARTSCHWAGER, 1924); in Nr. 3 ,4 u. 5 vom parenchymatischen Lagergewebe genau innerhalb des Gefässbündelringes; in Nr. 6 u. 7 vom Gefässbündelring und dem nach aussen liegenden parenchymatischen Lagergewebe.

Die Atmung in den Gefässen Nr. 1—5, also der innerhalb des Gefässbündelringes gelegenen Gewebe, zeigt eine etwa gleiche

Grösse (durchschn. 73.5 mm^3 O_2/Stunde), während das peripherische Gewebe (Gefässe Nr. 6 u. 7) eine bedeutend höhere Atmungsgrösse aufweist (105.4 mm^3 O_2/Stunde, also 43 % höher).

In einem Versuch mit ganzen Zylindern statt Schnitten (s. S. 211) stellte sich gleichfalls die höhere Atmungsintensität dieser Gewebezone heraus.

Zur Erzielung einheitlichen Materials soll beim Bohren der Zylinder die Lage des Gewebes dem Gefässbündelring gegenüber daher genau berücksichtigt werden. In der Regel wurden die Zylinder in einem Kreis innerhalb des Gefässbündelringes weggenommen. Eine normale Knolle lieferte in dieser Weise bequem 7 bis 8 Zylinder, also für eine Versuchsreihe genügend einheitliches Material.

4. Der respiratorische Quotient des Kartoffelgewebes.

a. *Gewebezylinder.* Die Anwesenheit der Suspensions-Flüssigkeit, in der ein Teil der gebildeten Kohlensäure zurückblieb (s. Abschn. II), komplizierte die R.Q.-Bestimmung der Gewebeschnitten. Bei Anwendung von Gewebezylindern war jedoch keine Suspensions-Flüssigkeit benötigt. Ohne Lauge in den Gefässen ermittelten die Manometerstände in diesem Falle unmittelbar den Differenzwert zwischen gebildeter CO_2 und aufgenommenem O_2, vorausgesetzt, dass im Gewebe keine weitere CO_2 zurückgehalten wurde. Zur Feststellung der Menge verschwundenen Sauerstoffs wurde das Gefäss in der nächsten Versuchsperiode mit Lauge versehen, während zugleicherzeit der Steigung der Atmung, wie diese aus Parallelversuchen hervorging, Rechnung getragen wurde. Auf diese Weise ergab sich mit Zylindern, die bereits einige Tage vorher geschnitten und abgespült waren, ein R.Q. von 1.02, also von annähernd 1.00.

b. *Gewebeschnitten.* Die *frisch-geschnittenen,* nicht-gewässerten Scheibchen zeigten einen niedrigen R.Q., der ausserdem, wahrscheinlich infolge des grossen mittleren Fehlers, den diese Schnitten bei Vergleichung der Atmungsgrössen der einzelnen Gefässe aufwiesen, stark variierte (zwischen 0.58 und 0.80). Möglicherweise nahmen die Reste der angeschnittenen Zellen eine Menge O_2 auf und es kann auf diese Weise das Zurückbleiben der Kohlensäurebildung hinter dem O_2-Verbrauch erklärt werden.

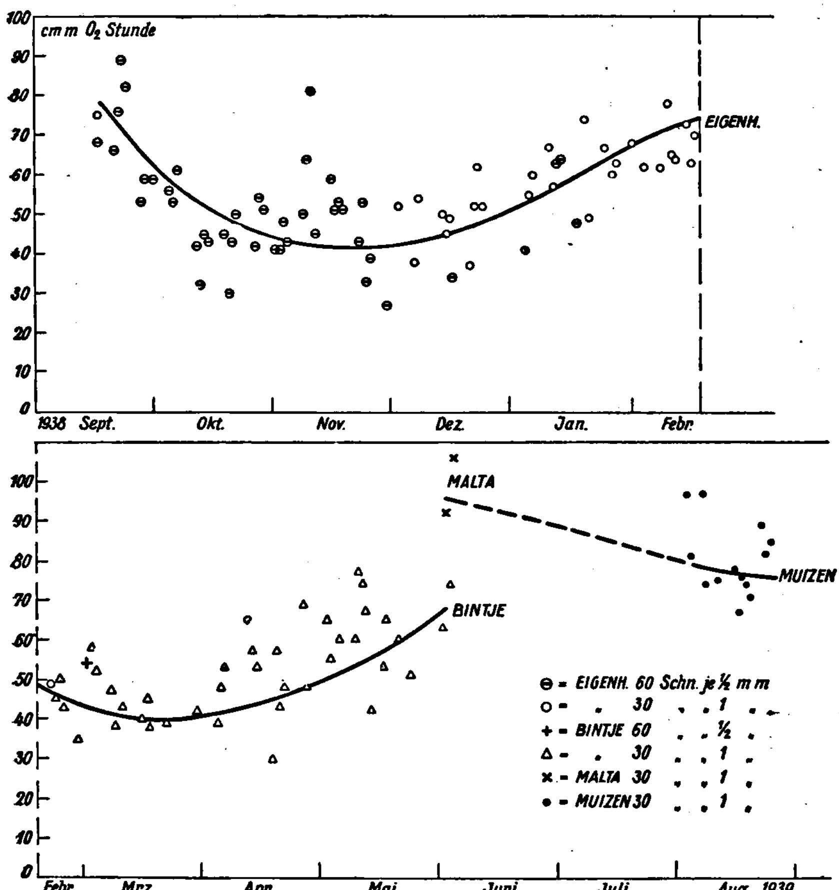
Der R.Q. der *gewässerten* Schnitten stellte sich jedoch, den Literaturangaben entsprechend, auf etwa 1.00. Die gefundenen Werte schwankten zwischen 1.02 und 1.07, aber die Abweichungen von 1.00 können den Fehlern, die der Methodik anhängen, zugeschrieben werden.

Es scheint also erlaubt zu sein, den R.Q. gut-aerierten und gespülten Kartoffelgewebes festzustellen auf 1.00. Die beschriebenen

Resultate, sowohl mit den gewässerten, wie mit den frischgeschnittenen Scheibchen, entsprechen durchaus den obenerwähnten Ergebnissen von BOSWELL u. WHITING.

5. Die Atmungsgrösse im Laufe des Jahres.

Die Atmungsversuche, über die in vorliegender Arbeit berichtet wird, wurden in dem Zeitabschnitt zwischen April 1938 bis zu Ende August 1939 vorgenommen. Das Wässern der Schnitten wurde Anfang September 1938 eingeführt, so dass die Beobachtungen be-



Figur 1. Der Verlauf der Atmungsgrösse im Laufe des Jahres.

treffs des Saisonverlaufs der Atmung (von gewässerten Schnitten) sich auf ein ganzes Jahr erstrecken, mit Ausnahme einer Unterbrechung in Juni und Juli.

Die Angaben stammen nicht aus speziellen Versuchsreihen, sondern sind den gesamten Atmungsversuchen entnommen worden und werden hier nebenbei (*Fig. 1*) veranschaulicht, weil es vielleicht nicht ohne Gewicht ist, den Verlauf der Atmungsgrösse im Laufe der Monate zu verfolgen.

Die Atmungsgrösse wird, wie üblich, ausgedrückt in mm^3 O_2 pro Stunde und pro Gefäss, d.h. also pro 30 oder 60 Schnitten von respektive 1 oder ½ mm Dicke und 6 mm Durchschnitt. Die Menge Kartoffelmaterial wird somit auf Volumenbasis ausgedrückt und dieser Vorgang bietet eine mindestens so konstante Grundlage zu Vergleichungen, wie das gewöhnlich gebrauchte Trockengewicht, weil beim Kartoffelknollengewebe das Trockengewicht in hohem Masse vom Stärkegehalt, der während der Lagerperiode abfällt, bestimmt wird.

Die Übersicht (*Fig. 1*) umfasst die Klone „Eigenheimer", „Bintje" und die im Sommer verwendeten frühen Kartoffeln, mit verschiedenen Merkmalen bezeichnet, während ausserdem die Schnitten von 1 und ½ mm Dicke verschieden angedeutet werden. Die verzeichneten Atmungsgrössen sind die Mittel je einer Versuchsreihe (meistens von 7 Gefässen, mit einem mittleren Fehler von einigen Prozenten), die aus den Beobachtungen in der ersten Versuchsstunde, also im blanko Versuch, berechnet sind.

Es betrifft durchweg nur diejenigen Versuche, in denen die Schnitten *eine* Nacht gewässert wurden und in denen die Phosphatpufferlösung mit pH 6.2 zur Anwendung kam.

Es zeigt sich aus den Ergebnissen, dass die Atmung der frühen Kartoffeln und des Klons „Eigenheimer" im Anfang des Ruhestadiums hoch ist, aber bald (wenigstens bei „Eigenheimer") im Sinken begriffen ist, um gegen das Ende des Ruhestadiums (Anfang Dezember bei „Eigenheimer" und Anfang April bei „Bintje"), noch vor dem Treiben der Sprosse wieder anzusteigen. Es ist bemerkenswert, dass die Kurve des Klons „Bintje", soweit die vorhandenen Angaben diesen Schluss erlauben, eine Wiederholung, zu einem späteren Zeitabschnitt, der Atmungskurve des Klons „Eigenheimer" bildet.

Selbstredend sind diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den Verlauf der Atmungsintensität von ganzen Knollen zu übertragen. Während für die Atmung der Knollen die innere Sauerstoffspannung eine beschränkende Bedingung sein kann, ist die Atmung der Gewebescheibchen von anderen Faktoren limitiert, die völlig unabhängig vom partiellen Sauerstoffdruck im Laufe des Jahres in Grösse

variieren könnten. In dieser Hinsicht wird zunächst an die den Zellen zur Verfügung stehenden Mengen oxydierbaren Substrats gedacht.

ABSCHNITT IV.

DIE ATMUNG DES INFIZIERTEN KARTOFFELGEWEBES.

In *Tabelle 8* sind die Ergebnisse zweier Versuche mit infizierten Gewebezylindern aufgenommen.

Im ersterwähnten Versuch war die Atmungsgrösse der infizierten Zylinder 130 bis 150 % höher als die der nicht-infizierten. Die erzielten Zahlen weisen nur eine geringe Variationsbreite auf und ergeben somit ein zuverlässiges Bild der ausserordentlich gesteigerten Atmung nach dem Befall durch *Gibberella Saubinetii.*

Der respiratorische Quotient, der für das gesunde Gewebe 1.02 betrug, bezifferte sich für das erkrankte Gewebe auf 0.84. Das heisst also, dass bei einer Steigung der Sauerstoffaufnahme um etwa 140 % die Kohlensäureabscheidung nur um etwa 100 % zunimmt. Das Zurückbleiben der CO_2-Abgabe kann auf verschiedene Weise erklärt werden. Entweder die Atmung des Parasiten oder eine abgeänderte Atmung des Wirtes könnte für den niedrigeren Atmungsquotienten verantwortlich sein. Es wäre denkbar, dass der Pilz statt Kohlehydrate die stickstoffhaltigen Stoffe als Atmungssubstrat verwendet.

Lepik (1929, 1940), der den Biochemismus der *Phytophthora*-Fäule der Kartoffelknolle studierte, konnte nachweisen, dass stickstoffhaltige Stoffe die Energiequelle des Parasiten bilden.

Gibberella Saubinetii ist jedoch ein zuckerliebender Pilz, der u.a. gutes Wachstum zeigt in der zuckerreichen Richards-Nährlösung. Ausserdem wurde in Versuchen mit Sporensuspensionen dieses Pilzes festgestellt, dass der O_2-Verbrauch der Sporen in ½ %iger Zuckerlösung etwa 5 mal grösser ist als im Phosphatpuffer und dass der R.Q. 1.33 beträgt, gegen 1.04 im Puffer. Im ersten Falle tritt somit aerobe Gärung auf. Alle diese Tatsachen weisen darauf hin, dass dieser Pilz Kohlehydrate als Energiequelle bevorzugt. Der niedrige R.Q. findet dann auch eine plausibelere Erklärung in der Annahme, der Quotient habe nur scheinbar einen niedrigen Wert. Das wäre dadurch ermöglicht, dass entweder die gebildete CO_2 zum Teil im erkrankten Gewebe festgelegt wird, das bald eine alkalische Reaktion (s. später) aufweist, oder ein Teil des aufgenommenen O_2 durch irreversibele Oxydation im absterbenden Gewebe an Plasma-

reste oder an Stoffwechselprodukte gebunden wird. Wie dem auch sei, aus diesem Versuch geht deutlich die erhöhte Atmung des befallenen Pflanzenkörpers hervor, unabhängig von der Möglichkeit, dass ein Teil des Sauerstoffs nicht wirklich veratmet würde.

TABELLE 8.

1. Versuch: 26-7-38.
Hauptraum: der Gefässe 1 u. 4 in den ersten 2 Stunden **leer**, nachher mit 1 cm^3 KOH 25%.
der Gefässe 2, 3, 5 u. 6: 1 cm^3 KOH 25 %.
Birne: leer.
Einsatz: Kartoffelzylinder, gesund oder infiz. m. *Gibb. Saub.*, 30 × 6 mm, 22-7-38 geschnitten aus „Eigenheimer".

Gefäss Nr.	Einsatz	Volumenabnahme in mm^3/St.			
		1.	2.	3.	4. Stunde
1	Gesunder Zylinder	**— 2.3**	**— 0.2**	58.6	70.6
2	„ „	57.2	64.4	64.9	71.1
3	„ „	52.2	63.9	63.1	67.8
4	Infizierter Zylinder	**19.3**	**25.9**	141.1	152.4
5	„ „	144.3	150.0	147.4	153.6
6	„ „	154.1	158.6	156.0	160.1

2. Versuch: 14-8-39.
Hauptraum: 1 cm^3 KOH 25 %; Gefässe 2, 4 u. 6 in der 4ten St. **ohne Lauge.**
Birne: leer.
Einsatz: Kartoffelzylinder, gesund oder infiz. m. *Gibb. Saub.* oder *Fus. trich.*, 35 × 6 mm, 11-8-39 geschnitten, „Muizen".

Gefäss Nr.	Einsatz	Volumenabnahme in mm^3/St.			
		1.	2.	3.	4. Stunde
1	Gesunder Zylinder	79.4	93.6	101.9	111.0
2	„ „	60.9	76.5	83.4	**— 7.8**
3	Infiziert mit *Gibb. Saub.*	143.4	159.5	165.4	171.2
4	„ „ „ „	133.4	131.5	123.4	**63.8**
5	„ „ *Fus. trich.*	203.4	195.6	178.6	152.8
6	„ „ „ „	138.8	135.5	125.4	**49.9**

Atmungsquotient: gesundes Gewebe 1.09
(annähernd) inf. m. *Gibb. Saub.* 0.45
inf. m. *Fus. trich.* 0.57

Der zweite Versuch (*Tabelle 8*) zeigt ähnliche Ergebnisse und ergibt ausserdem, dass nach Befall durch *Fusarium trichothecioides*, das eine Trockenfäule der Kartoffelknolle hervorruft, ein gleicher Effekt auftritt. Die Infektion war in diesem Falle, besonders bei *F. trichothecioides*, bereits weit vorgeschritten: die Gewebezylinder

verloren ihre Turgeszenz, erschlafften und waren im Absterben begriffen. Dieser Umstand erklärt die herabsinkende Atmungskurve, welche die Zylinder in 3 der Gefässe aufweisen. Auch die sehr niedrigen Atmungsquotienten, die annäherungsweise festgestellt wurden, können nur dadurch erklärt werden, dass im absterbenden Gewebe CO_2 oder O_2 festgelegt wird, wie es bereits oben erwähnt worden ist.

Das Stadium der erhöhten Atmung ist allerdings vorübergehender Natur und wird aufhören, sobald das Gewebe weitgehend verfault und abgetötet ist, vorausgesetzt, dass die eigene Atmung des Parasiten die ursprüngliche Atmungsintensität des gesunden Kartoffelgewebes nicht übersteigt.

Zusammenfassung: 1. Kartoffelteile, die von *Gibberella Saubinetii* und *Fusarium trichothecioides* befallen sind, zeigen eine bedeutend höhere Atmung als gesundes Gewebe, wenigstens in den Anfangsstadien der Erkrankung.

2. Nicht nur die Menge verschwundenen O_2, sondern auch die Menge frei gewordener CO_2 wird gesteigert, letztere jedoch in geringerem Masse, wahrscheinlich dadurch, dass mit dem Fortschritt des Befalls ein Teil des aufgenommenen O_2 oder der gebildeten CO_2 im faulenden Gewebe gebunden wird.

Dementsprechend erfährt der Atmungsquotient nur eine scheinbare Herabsetzung gegenüber dem des gesunden Gewebes.

ABSCHNITT V.

DER EINFLUSS VON STOFFEN, VOM PILZ IN REINKULTUR GEBILDET, AUF DIE ATMUNG DES KARTOFFELGEWEBES.

Im ersten Abschnitt wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass die aktivierte Atmung des infizierten Kartoffelgewebes — wenigstens teilweise — verursacht sei von Substanzen, die vom Krankheitserreger ausgeschieden werden.

In diesem Gedankengang lag es nahe, zunächst zu untersuchen, ob vom Pilz in Reinkultur Stoffe gebildet werden, die einen Einfluss auf die Atmung des Wirtsgewebes ausüben. Dabei wurde ins Auge gefasst, dass eine etwaige Einwirkung von Stoffen, vom Pilz herrührend, deutlich zu unterscheiden sein sollte von einem Einfluss, der hervorgebracht werden könnte von Änderungen der physischen oder physisch-chemischen Milieubedingungen, wie z.B. von einer

Änderung des pH im Atmungsmilieu. Deshalb war denn auch die Suspensionsflüssigkeit gepuffert, währenddem das pH nach Beendigung des Versuchs obendrein noch kontrolliert wurde, damit etwaige Abänderungen festgestellt werden könnten. Bedeutende Verschiebungen des pH sind jedoch nie aufgefunden worden.

Ein Pilz in Reinkultur oder auf dem natürlichen Substrat scheidet, wie jeder lebende Organismus, Stoffwechselprodukte aus. Man kann die abgegebenen Stoffe unterscheiden als Exkrete, wenn sie nur als unbrauchbare Reste ausgeschieden werden und als Sekrete, wenn sie in der Biologie des Organismus noch weiter irgend eine Rolle spielen. Diese gebräuchliche Unterscheidung lässt sich jedoch nicht immer in aller Schärfe durchführen. So gehört gewiss ein grosser Teil der mit dem Sammelbegriff „Toxine" bezeichneten Substanzen zu den Abfallstoffen des Stoffwechsels, im Gegensatz zu den organischen Wirkstoffen (JANKE, 1939), wie Enzyme, Vitamine und Hormone, die vom Organismus synthetisiert und gleichfalls ausgeschieden werden können. Während letztere Gruppe ohne weiteres als Sekretstoffe anerkannt werden, ist die Stellung der erstgenannten Substanzen nach dieser Unterscheidung nicht sofort ganz klar. Vielfach wird es sich bei den Toxinen um unbrauchbare Reste des Stoffwechsels handeln, die jedoch in der Biologie des parasitischen Pilzes — und insbesondere im Leben des Perthophyten — allerdings eine nützliche Rolle spielen, z.B. durch Anregung oder Tötung der Wirtszellen beim Eintritt oder beim Fortschritt des parasitären Verhältnisses.

Falls vom Pilz ausgeschiedene Stoffe also irgend eine anregende physiologische Wirkung ausüben, lässt es sich von vornherein nicht feststellen, ob es sich um Syntheseprodukte oder lediglich um Stoffwechselreste des Pilzes handelt. Sogar die Thermostabilität dieser Stoffe gibt keine Auskunft, da es thermostabile Wirkstoffe und thermolabile Giftstoffe gibt.

Ausgeschiedene Stoffe, die physiologisch-fördernd wirksam sind, können auch unterschieden werden nach der Natur ihrer Wirkung auf andere Organismen. Sie dienen diesen entweder als Nährstoffe oder sie kommen als Material zur Energielieferung und für den Zellaufbau nicht in Frage. Im letzteren Falle handelt es sich um Stoffe, die schon in geringer Menge wirken. Auch hier ist jedoch eine scharfe Trennung den Nährstoffen gegenüber nicht immer möglich. Stoffe, die als Atmungssubstrat auftreten, sind in ihrer Wirkung auf ihren Energielieferungswert beschränkt. Wenn also im Atmungsversuch von einer Substanz ein Sauerstoffmehrverbrauch herbeigeführt wird,

der grösser ist als die zum oxydativen Abbau dieser Substanz benötigte Menge Sauerstoff, dann ist daraus zu schliessen, dass ein Wirkstoff vorliegt, d.h. ein Stoff, der als Biokatalysator wirkt.

Die fraglichen vom Pilz gebildeten Substanzen werden sich eventuell sowohl in den Pilzhyphen, als in der Kulturflüssigkeit vorfinden. BROWN (1917) erzielte eine Cytase- (= Pektinase-)Wirkung nicht nur mit der Flüssigkeit, in der Sporen von *Botrytis cinerea* gekeimt hatten, sondern auch mit aus den gekeimten Sporen bereiteten Extrakten. Daher kam in vorliegender Arbeit der Myzelextrakt neben der Kulturflüssigkeit zur Auffindung etwaiger atmungsaktivierenden Substanzen zur Anwendung.

1. Myzelextrakte von *Gibberella Saubinetii* und von einigen anderen Pilzen (Extrakt I).

Aus zahlreichen Versuchen mit dem Rohextrakt I von *Gibb. Saub.* stellte sich immer wieder heraus, dass diese Flüssigkeit Stoffe enthält, welche die Atmung der Kartoffelscheibchen beeinflussen. Die Atmungskurve zeigt eine schnelle Steigung auf ein neues Niveau, das sich im allgemeinen während des weiteren Versuchsverlaufs behauptet.

In weiteren Versuchen wurde eine Anzahl Angaben über die Eigenschaften der in Frage stehenden Stoffe erzielt. Es folgt hier eine Übersicht der wichtigsten Ergebnisse der mit Extrakt I angestellten Versuche. Falls nicht anders erwähnt, handelt es sich durchweg um Extrakt aus dem Myzel von *Gibberella Saubinetii*.

a. *Extrakte von Myzelien aus verschiedenen Kulturen.* Die Extrakte wurden aus gleichen Gewichtsmengen Pilzmaterial gewonnen. Dieses Material stammte aus Reinkulturen verschiedenen Alters und zu verschiedenen Jahreszeiten gezogen. Die Wirkung dieser Extrakte wies nur geringfügige quantitative Unterschiede auf, wenn die Teste nur gleichzeitig auf das Gewebe einer einzigen Knolle ausgeführt wurden (*Tabelle 9, Fig. 2*).

Fünf der 6 Extrakte im vorliegenden Versuch waren aus Myzelpulver hergestellt, das kürzer oder länger im Exsikkator aufbewahrt war. Sie steigerten alle die Atmungsgrösse sofort (d.h. innerhalb einer Stunde) auf ein Intensitätsniveau, das etwa 100 % über dem der Anfangsatmung lag. Auch der Extrakt im Gefäss Nr. 7, aus dem Myzel einer frischen Kultur bereitet, erhöhte die Atmung auf das gleiche Niveau, obgleich dabei von einer unbestimmten Trockengewichtsmenge ausgegangen war.

Man könnte einwenden, dass in dieser Versuchsreihe in allen Gefässen zufälligerweise ein von anderen Bedingungen limitiertes

TABELLE 9. (s. Fig. 2).

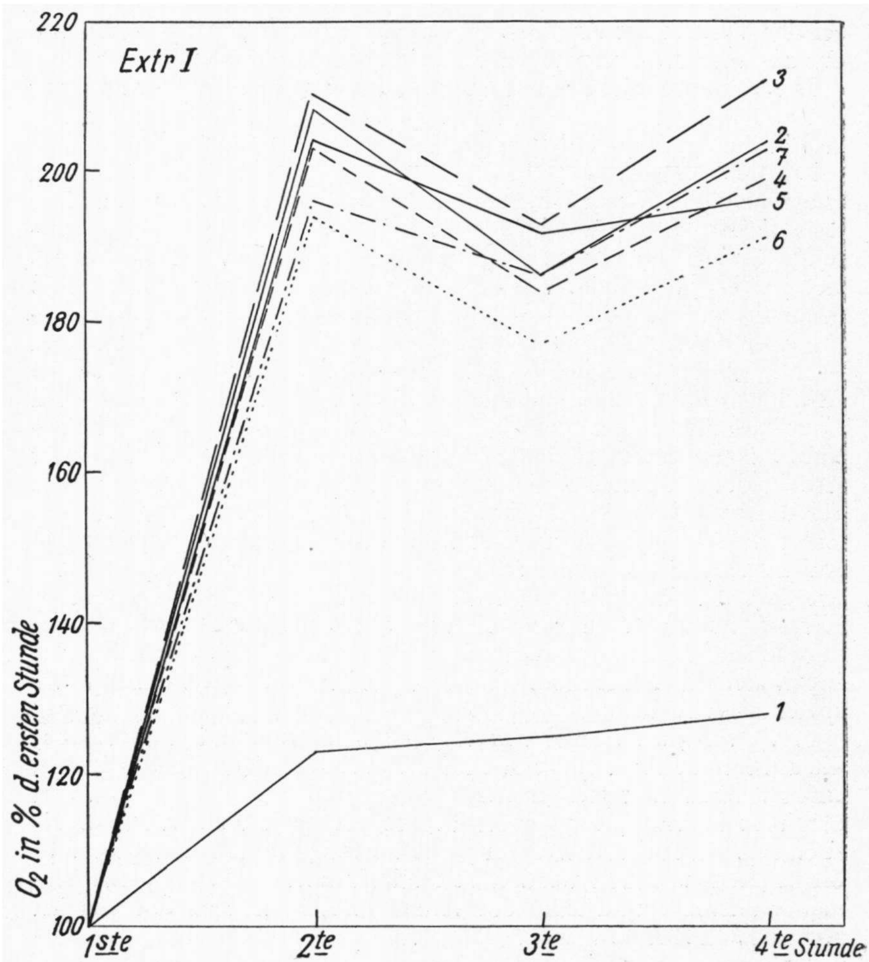
Versuch: 20-10-38.
Hauptraum: 60 Sch. von ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 Extrakt I (nach der ersten Stunde), oder dest. Wasser.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Gefässe 2—6: 0.221 g Trockenmyzel in 10 cm^3 dest. W.
Gefäss 7: frisches Myzel aus einem 500 cm^3-Kolben, mit Sand zerrieben, extrahiert in 15 cm^3 dest. Wasser.
Bei Zimmertemperatur extrahiert, zentrifugiert und Extrakte 10 Minuten bei 100° C. erhitzt.

Gefäss Nr.	Zusatz	Kultur d. Pilzes	verbrauchter Sauerstoff: mm^3/Stunde 1. St.	verbrauchter Sauerstoff: in Proz. d. ersten Stunde 2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser		42.8	123	125	128
2	Extr. I	14—21/5/38	41.6	208	186	204
3	„	12/9—6/10/38	42.6	210	193	212
4	„	12—24/9/38	38.9	203	184	199
5	„	20/5—11/6/38	45.3	204	192	196
6	„	20/5—4/6/38	46.4	194	177	191
7	„	12/9—19/10/38	43.3	196	186	203

maximales Atmungsniveau erreicht würde, so dass quantitative Unterschiede der Atmungsgrössen sich nicht länger bemerkbar machen könnten. Tatsächlich wurde in keinem anderen Versuch, auch nicht mit höheren Konzentrationen im Extrakt, jemals ein bedeutend höherer Effekt erzielt.

Dagegen erfolgten bei Verdünnung des Extrakts von 1 auf 10 (s. unten) sofort niedrigere Wirkungen. Und auch in anderen Versuchen wurde von gleichen Gewichtsmengen Trockenmyzel, aus verschiedenen Kulturen stammend, immer wieder ein gleicher Effekt hervorgerufen (s. Abschn. V-n).

Wenn also die Extrakte aus Myzelien verschiedener Kulturreihen eine annähernd gleiche Aktivität pro Gewichtsmenge aufweisen, so wird doch die Grösse des Einflusses auf die Atmung mitbestimmt von der physiologischen Disposition und damit von dem Reaktionsvermögen des Kartoffelgewebes. Es stellte sich heraus, dass das Gewebe verschiedener Knollen und in verschiedenen Jahreszeiten getest, nicht immer in gleichem Masse auf einen bestimmten Extraktzusatz reagierte. Der obenerwähnte Versuch (*Tabelle 9*) wurde in einer Periode angestellt, in der, wie es sich später zeigte, die Atmungserhöhung des Kartoffelgewebes ihren höchsten Wert erreichte.



Figur 2, s. Tabelle 9.

Eine Vergleichung zwischen den verschiedenen Versuchsreihen, insofern es die Grösse des Effekts betrifft, ist somit oft nicht zulässig. Die Ursache der Unterschiede der Wirkungen in *einem* Versuch, im Vergleich mit denen im *anderen*, liegt unseres Erachtens in den physiologischen Umwandlungen des Knollengewebes während des Lagerns, bei dem offenbar eine Änderung auftritt in den Faktoren, die den Atmungsmechanismus regulieren. In diesem Zusammenhang

sei der Verlauf der Atmungsgrösse während der Lagerperiode, wie der aus Fig. 1 ersichtlich ist, in Erinnerung gebracht.

Der Zeitabschnitt des höchsten Reaktionsvermögens der Atmung lief von Ende September bis zur zweiten Hälfte Oktober und fiel also in die „Ruheperiode" der Kartoffelknolle.

Da die Anfangsatmung in dieser Periode niedrig war, könnte man entgegnen, dass dieser Umstand vielleicht dafür verantwortlich wäre, dass die Atmungsgrösse in diesem Zeitabschnitt eine solche bedeutende Steigerung erfahren konnte. Aus anderen Versuchen ergab sich jedoch (s. Abschn. V-n), dass in Perioden mit hoher, sowohl als in anderen mit niedriger Anfangsatmung auch von hohen Konzentrationen des Extrakts niedrigere Effekte als im vorliegenden Versuch — nur 40 bis 50 %ige Erhöhung — erzielt wurden. Die starke Atmungsreaktion während erstgenannter Periode muss daher wohl einer besonderen physiologischen Beschaffenheit des Kartoffelgewebes zugeschrieben werden. Es handelte sich in vorliegender Arbeit nicht in erster Linie um eine Untersuchung der Physiologie der Kartoffelknolle und diese an sich interessante Frage konnte leider nicht eingehend studiert werden, wo das Hauptproblem alle Aufmerksamkeit erforderte. Die gesteigerte Atmung behauptete sich, wie *Fig. 2* zeigt, nicht immer sofort auf einem völlig konstanten Niveau, sondern erfuhr nach der zweiten Stunde meistens einen schwachen Rückgang, um nachher wieder an zu steigen. Auf dieses Einsinken der Atmungskurve in der dritten Stunde kommen wir später noch zurück.

b. *Wirkung der Extrakte in starker Verdünnung.* Die Substanzen, die im letztgenannten Versuch die Atmungssteigerung bewirkten, rührten von relativ grossen Mengen Myzel her. Die Extrakte waren bereitet aus 0.221 g Myzelpulver in 10 cm^3 dest. Wasser. In parasitischen Verhältnissen würden jedoch etwaige atmungsaktivierende Stoffe ausgeschieden werden von relativ sehr geringen Gewichtsmengen Myzel und falls der Atmungseffekt nur erzielt werden könnte nach Zusatz von Extrakten aus grösseren Mengen Pilzmaterial, wäre es unzulässig, die auf diese Weise erhaltenen Resultate auf den natürlichen, parasitären Vorgang zu übertragen als mögliche Erklärung der erhöhten Atmung, die am infizierten Gewebe festgestellt wurde.

Aus diesem Grunde wurde geprüft, ob auch sehr geringe Mengen der Myzelextrakte noch einen wahrnehmbaren Einfluss auf die Atmung des Gewebes ausübten.

Derartige Versuche wurden öfters ausgeführt und ebenso wie im vorigen Paragraph zeigte es sich auch hier, dass der Effekt von bestimmten Extraktkonzentrationen nicht immer gleich gross war.

Tabelle 10 gibt eine Übersicht mehrerer, mit verschiedenen Extraktverdünnungen angestellten Versuche.

TABELLE 10.

1. Versuch: 27 u. 28-9-38.
Hauptraum: 60 Schn. von ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm³ dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.6 cm³ KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: 1.05 g Trockenmyzel (Kultur: 14—24/5/38) in 30 cm³ dest. Wasser bei Zimmertemp. extrahiert, zentrifugiert, autoklaviert und verdünnt mit dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Zusatz	Verdünnungen	verbrauchter Sauerstoff			
			mm³/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
			1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser		57.1	102	105	113
2	Extrakt I	unverdünnt	53.6	176	183	193
3	„	1 : 5	54.0	174	175	186
4	„	1 : 25	48.7	162	146	157
5	dest. Wasser		56.3	102	112	117
6	Extrakt I	1 : 125	60.2	136	123	132
7	„	1 : 625	59.3	130	120	125
8	„	1 : 3125	59.9	124	122	125

2. Versuch: 12-10-38. (s. Fig. 3).
Hauptraum: 60 Sch. von ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm³ dest. Wasser oder Extrakt I (nach d. 1sten St.).
Einsatz: 0.6 cm³ KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: 0.543 g Trockenmyzel (Kultur: 14—24/5/38) in 15 cm³ dest. Wasser autoklaviert, dekantiert, verdünnt mit sterilem dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Zusatz	Verdünnungen	verbrauchter Sauerstoff			
			mm³/Stunde	in Proz. d. 1sten Stunde		
			1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser		34.1	107	120	129
2	Extrakt I	$1 : 10^5$	31.1	122	130	135
3	„	$1 : 10^4$	30.4	133	135	139
4	„	$1 : 10^3$	30.3	151	138	146
5	„	$1 : 10^2$	34.3	162	144	159
6	„	1 : 10	33.1	194	178	190
7	„	unverdünnt	33.4	218	203	204

3. Versuch: 8-11-38.
Hauptraum: 60 Sch. von ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Extr. I (nach d. 1sten Stunde).
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: 0.195 g Trockenmyzel (Kultur: 20/5—11/6/38) in 5 cm^3 dest. Wasser bei Zimmertemp. extrahiert, zentrifugiert, verdünnt und autoklaviert.

Ge-fäss Nr.	Zusatz	Verdünnungen	verbrauchter Sauerstoff			
			mm^3/Stunde	in Proz. d. 1sten Stunde		
			1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser		52.5	114	117	119
2	Extrakt I	1 : 10^7	50.7	118	118	119
3	„	1 : 10^6	47.6	117	119	119
4	„	1 : 10^5	52.2	121	120	121
5	„	1 : 10^4	48.5	118	120	121
6	„	1 : 10^3	49.9	126	125	125
7	„	1 : 10^2	50.1	150	136	140

4. Versuch: 22-11-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: 0.221 g Trockenmyzel (Kultur: 12/9—6/10/38) in 10 cm^3 dest. Wasser längere Zeit bei Zimmertemp. extrahiert, zentrifugiert, erhitzt, verdünnt mit sterilem dest. Wasser.

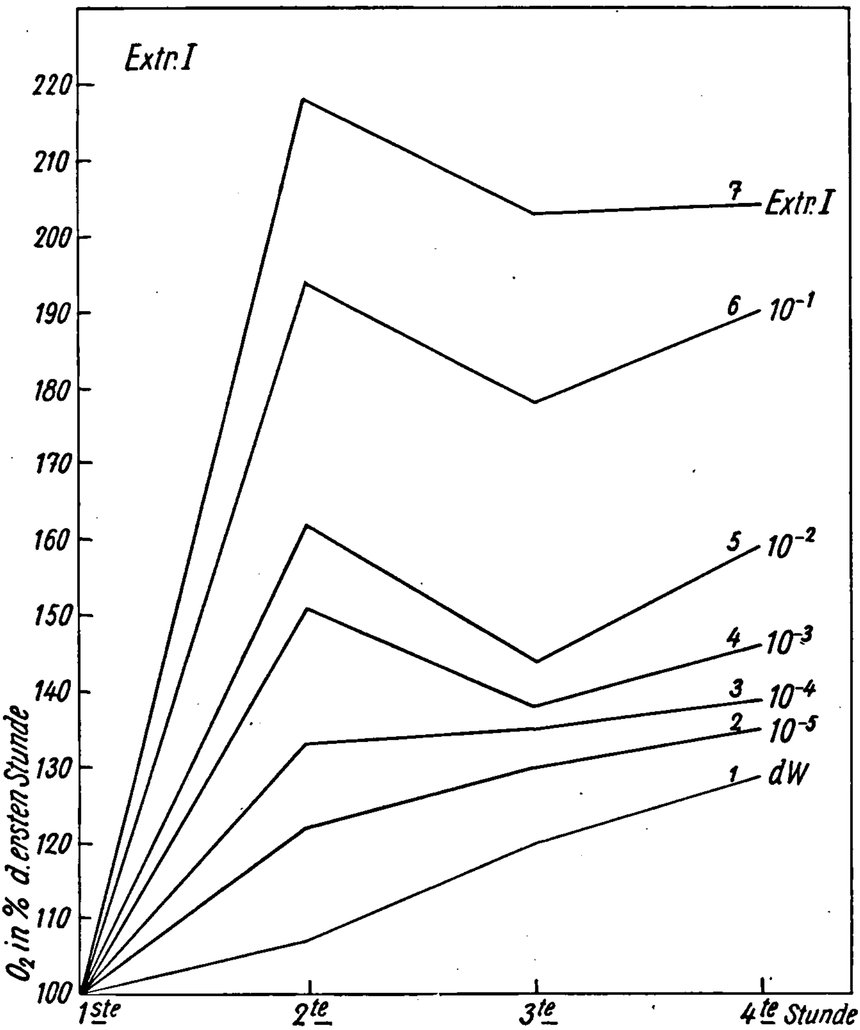
Ge-fäss Nr.	Zusatz	Verdünnungen	verbrauchter Sauerstoff			
			mm^3/Stunde	In Proz. d. 1sten Stunde		
			1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser		43.6	106	120	134
2	Extrakt I	1 : 10^5	41.4	104	122	131
3	„	1 : 10^4	42.7	104	119	129
4	„	1 : 10^3	38.9	108	123	129
5	„	1 : 10^2	45.4	116	124	130
6	„	1 : 10	47.9	132	130	141
7	„	unverdünnt	42.0	168	157	182

5. Versuch: 13-1-39.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: 1 g Trockenmyzel (Kultur: 31/10—21/11/38) in 20 cm^3 Alkohol 80 % während 15 Minuten bei 80—90° C. extrahiert, zentrifugiert, eingedämpft, gelöst in 5 cm^3 dest. Wasser (Trockengewicht: 14 mg/cm^3), verdünnt.

Gefäss Nr.	Zusatz	Verdünnungen	verbrauchter Sauerstoff				
			mm^3/ Stunde	In Proz. d. 1sten Stunde			
			1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser		65.6	110	124	137	142
2	„ „		66.7	111	120	134	143
3	Extrakt I	$1:10^4$	65.5	113	124	132	140
4	„	$1:10^3$	62.9	118	121	134	140
5	„	$1:10^2$	65.2	128	127	140	150
6	„	unverdünnt	64.3	174	166	173	183

In der bereits erwähnten empfindlichen Periode des Kartoffelgewebes — Ende September/ Mitte Oktober — ergaben starke Verdünnungen noch deutliche Atmungserhöhungen im Vergleich zu der Kontrolle (dest. Wasser).

Im Versuch vom 28. Sept. hatte die stärkste Verdünnung von ca. 1 in 3.10^3 — dem wasserlöslichen Teil von 6.7 γ Myzelpulver entsprechend — noch einen unverkennbaren Effekt. Am 12. Okt. wurde diese Wirkung noch übertroffen vom Extrakt in der Verdünnung 1 in 10^5 — d.h. ein wasserlöslicher Teil von 0.2 γ Myzelpulver pro Gefäss — der eine deutliche Atmungssteigerung der Kontrolle gegenüber verursachte (s. *Fig. 3*). Am 8. Nov. jedoch zeigte das Kartoffelmaterial sich schon viel weniger reaktionsfähig und konnte mit Verdünnungen unter 1 in 10^3 keine Atmungserhöhung mit hinreichender Sicherheit nachgewiesen werden ($1:10^3$ = Extrakt aus 23.4 γ Myzelpulver). Nachher (22. Nov.) war es der wasserlösliche Teil von 66.3 γ Myzelpulver — eingedämpft mit einem Trockengewicht von 22.5 γ — der, als Mindestmenge einem Gefäss zugefügt, noch einen Atmungseffekt aufwies. Schliesslich hatte am 13. Jan. 60 γ Myzelpulver gerade noch eine wahrnehmbare Wirkung. In diesem Falle war der Extrakt jedoch auf eine abweichende Weise hergestellt: das Ausgangsmaterial wurde mit 80 %igem Alkohol bei 80 à 90° C. extrahiert und der Extrakt zur Trockne gedampft und in dest. Wasser gelöst. Nach diesem Verfahren betrug die Ausbeute



Figur 3, s. Tabelle 10 (2. Versuch).

alkohollöslicher Stoffe nur noch 7 % des Myzeltrockengewichts. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse soll also jedenfalls berücksichtigt werden, dass nur ein kleiner Bruchteil des Ausgangsmaterials — und wahrscheinlich auch nur ein kleiner Teil der gelösten Stoffe — für die beobachtete Wirkung verantwortlich gemacht werden kann.

Zweifelsohne betrifft es hier denn auch Substanzen, die schon in äusserst kleinen Konzentrationen wirksam sein können. Dass durch die sich ändernde physiologische Disposition die Reaktionsfähigkeit des Kartoffelgewebes, und damit der Effekt des wirksamen Prinzips, in einer Jahreszeit stärker hervortritt als in der anderen, ändert nichts an dieser Tatsache.

c. *Atmungserhöhung oder Oxydation?* In den bisher erwähnten Versuchen mit Extr. I wurde aus der gesteigerten Sauerstoffaufnahme — d.h. aus der am Manometer beobachteten Druckabnahme — gefolgert, dass die Atmung der Kartoffelschnitten unter Einfluss des Extrakts eine Erhöhung erfahren hatte. Die Sicherheit, dass es sich hier um eine wirkliche Atmungssteigerung handelt, wird aufgebracht von der Bestimmung des Atmungsquotienten, der nach Zusatz gewisser Mengen vom Extrakt keine wesentlichen Veränderungen erlitt.

Der Erfolg zweier Versuche war, dass dieser R.Q. berechnet werden konnte auf 1.06—1.09, während für Kartoffelschnitten in Phosphatpuffer, ohne jede Hinzufügung, ein R.Q. gefunden wurde von 1.02—1.07 (s. Abschn. III—4b). Die Abweichungen dieser Zahlen von der Einheit liegen bei der angewandten Methode etwa innerhalb der Fehlergrenzen. Jedenfalls ist es klar, dass die Steigerung der O_2-Aufnahme zusammen geht mit einer entsprechenden Mehrproduktion von Kohlensäure, so dass von einer wirklichen Atmungserhöhung des Kartoffelgewebes gesprochen werden darf.

Im Anschluss an diese Tatsache wird im folgenden Versuch dargelegt, dass die Mehratmung, die unter dem Einfluss des wirksamen Prinzips auftritt, nur zustande kommt mit Hilfe des Atmungsmechanismus des lebenden unverletzten Gewebes. 30 Schnitten von 1 mm Dicke wurden in einem Mörser zerrieben und der Gewebebrei mit 2 cm^3 Phosphatpuffer (pH 6.2) in das Manometergefäss eingefüllt. Der Einsatz enthielt 0.4 cm^3 Kalilauge und die Birne 0.3 cm^3 Extr. I (1 g Trockenmyzel/20 cm^3 dest. Wasser, erhitzt, filtriert). In der ersten Stunde betrug die Sauerstoffaufnahme des Gewebebreies 8.8 mm^3, in den folgenden 3 Stunden (also nach Extraktzusatz) resp. 11.1, 4.4 und 2.5 mm^3. In der zweiten Stunde hatte der Extraktzusatz folglich nur einen kaum wahrnehmbaren Mehrverbrauch von Sauerstoff (etwa 5 mm^3) zur Folge, während die sinkende Atmungskurve, wie sie der Kartoffelgewebebrei immer zeigte, sich bereits in der 3ten Stunde wieder fortsetzte.

Vergleicht man damit die Wirkung einer gleichen Menge desselben Extrakts auf 30 normale intakte Schnitten — mit resp. 74.3, 112.2, 113.9, 119.4 und 127.9 mm^3 in den ersten 5 St. — dann ist es durchaus klar, dass die in der zweiten Stunde beobachtete Atmungsstei-

gerung nicht beruht auf extra-cellulären Oxydationsvorgängen, sondern dass der Effekt verbunden ist mit den unverletzten Zellen des Kartoffelgewebes.

d. *Extraktwirkung und Blausäurehemmung.* In vielen pflanzlichen Geweben ist die Anwesenheit der Polyphenoloxydase oder Phenolase nachgewiesen worden und Kartoffeln gehören zu den Hauptobjekten, aus denen Ferment-Präparate gewonnen wurden. Von SZENT-GYÖRGYI u. VIETORISZ (1931) ist die Bedeutung der Phenolase für die normale Zellatmung angezweifelt worden, aber die Tatsache, dass die bei der Phenol-Oxydation gebildeten Chinone als Akzeptoren für den durch Dehydrasen aktivierten Wasserstoff der Zellsubstrate fungieren können, deutet darauf hin, dass die wesentliche Bedeutung des Ferments wohl in seiner Rolle bei der normalen Atmung liegt (SUTTER, 1936). Neuerdings konnten BOSWELL u. WHITING (1938) zeigen, dass etwa zwei Drittel der normalen Kartoffelatmung gehemmt wird durch Orthochinon, das bei der Oxydation von Brenzcatechin entsteht und das eine Schädigung des Ferments herbeiführt. Sie schlossen daraus, dass zwei Drittel der normalen Kartoffelatmung über das Polyphenoloxydase-System läuft, während das übrige Drittel einem anderen Oxydationssystem zugeschrieben wird.

KUBOWITZ (1937) zeigte, dass das Ferment eine Kupfer-Proteinverbindung ist und dass die spezifische Wirksamkeit in geradem Verhältnis zu dem Kupfergehalt steht.

Die Phenolase wird durch Blausäure gehemmt und angesichts der Frage der Natur und des Wirkungsmechanismus des wirksamen Prinzips im Extrakt I war es interessant, die Wirkung des Extrakts auf das von Blausäure gehemmte Atmungssystem festzustellen.

Zu diesem Zweck wurde eine Versuchsreihe angestellt, in der 0.3 cm^3 einer 6.10^{-3} m KCN-Lösung einigen Gefässen entweder in der Birne, oder sofort im Hauptraum zugesetzt wurde. Einem Teil der Gefässe war Extrakt zugefügt worden und dem anderen dest. Wasser (als Kontrolle-Flüssigkeit).

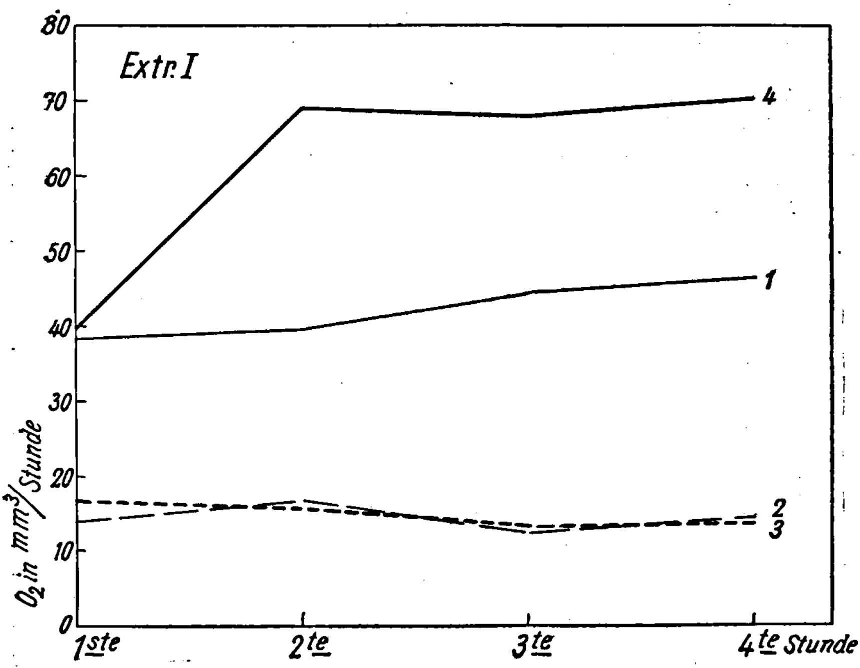
Die Blausäurekonzentration im Gefäss, nach Einkippen der Flüssigkeit aus der Birne, betrug — das Gewebevolumen als Flüssigkeit mit einbegriffen — 5.10^{-4} m oder etwa 1 in 30.000. Die Ergebnisse findet man in *Tabelle 11*, während in *Fig. 4* der Atmungsverlauf in den Gefässen 1—4 veranschaulicht wird.

Es erwies sich, dass die benutzte Blausäurekonzentration eine 60—65 %ige Hemmung der Atmung hervorruft (Gefässe 2, 3, 6 und 7 — die Hemmung in den Gefässen 6 und 7 ist in der ersten Stunde geringer, da sie nur von der gasförmigen Blausäure, die aus der KCN-Lösung in der Birne entwichen war, herbeigeführt wurde).

TABELLE 11. (s. Fig. 4).

Versuch: 25-11-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. $\frac{1}{2}$ mm, „Eigenheimer", in 2 cm^3 Phosphatpuffer (pH 6.2) und 0.3 cm^3 dest. Wasser, Extrakt oder KCN-Lösung (6.10^{-3} m).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser, Extrakt oder KCN-Lösung.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 5 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: wie in Tabelle 10 (Versuch 4), aber eingedämpft und wieder gelöst in dest. Wasser (Trockengewicht: 8 mg/cm^3).

Gefäss Nr.	Hauptraum	Birne (Zusatz)	verbrauchter Sauerstoff, mm^3/St.			
			1.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	dest. W.	38.2	39.5	44.5	46.4
2	KCN-Lösung	dest. W.	13.9	16.4	12.2	14.5
3	KCN-Lösung	Extrakt I	16.8	15.6	13.3	13.8
4	dest. Wasser	Extrakt I	39.7	68.9	67.8	70.2
5	Extrakt I	dest. W.	55.5	60.6	65.4	67.2
6	Extrakt I	KCN-Lös.	23.2	16.9	12.5	12.5
7	dest. Wasser	KCN-Lös.	21.9	17.5	17.2	17.4



Figur 4, s. Tabelle 11.

Die Wirkung des Extrakts, die in den Gefässen 4 und 5, also im Blausäure-freien Milieu, deutlich dargelegt wurde, unterblieb jedoch völlig auf die durch HCN gehemmte Atmung (Gefässe 3 und 6). Aus diesem Versuch geht somit hervor, dass der Extrakt keine Wirkung auf den nicht-gehemmten Bruchteil der Atmung ausübt, sondern nur auf den Blausäure-empfindlichen Teil einwirkt.

Wie oben erwähnt, soll nach BOSWELL u. WHITING das Blausäure-empfindliche Polyphenoloxydasesystem zwei Drittel der normalen Kartoffelatmung umfassen. Falls das „residuale" Drittel der Atmung nicht oder nur schwach durch Blausäure inaktiviert werden sollte — analog dem HCN-unempfindlichen „gelben" Oxydationsferment — so würde bei den niedrigen Blausäure-Konzentrationen nur das Polyphenoloxydasesystem, also $^2/_3$ der Gesamtatmung, gehemmt werden können.

Mit diesem Bild vor Augen liegt bei erneuter Betrachtung der Versuchsergebnisse der Gedanke nahe, dass die erzielte Hemmung von 60—65 % sich durchaus auf das Polyphenoloxydasesystem bezieht und dass das wirksame Prinzip im Extrakt I nur dieses System aktiviert.

Zwar ist nicht bewiesen worden, dass auch durch höhere Blausäure-Konzentrationen keine Hemmung der „residualen" Atmung von BOSWELL u. WHITING hervorgerufen werden kann (quantitative Versuche zur Feststellung der maximalen Hemmung waren nicht beabsichtigt und die Arbeit von B. u. W. gelangte erst nach Abschluss der Versuche zur Kenntnis des Verfassers), aber es liegt auf der Hand anzunehmen, dass im beschriebenen Falle hauptsächlich, wenn nicht ausschliesslich, das Polyphenoloxydasesystem durch HCN inaktiviert wird.

e. *Thermostabilität.* Meistenteils waren die benutzten Extrakte vorher, zur Abtötung etwaiger Bakterien oder Pilzsporen, aufgekocht oder autoklaviert worden (bei einem Überdruck von ½ Atmosphäre (112° C) während ½ Stunde). Die Aktivität, die diese Extrakte immerhin beibehielten, weist schon darauf hin, dass das wirksame Prinzip gewissermassen wärmebeständig ist und nicht durch Erhitzung bis 112° C zerstört wird.

Die Thermostabilität geht ausserdem klar hervor aus *Tabelle 12*, aus der sich ergibt, dass auch nach wiederholtem Autoklavieren die Wirkung des Extrakts sich nahezu ungeschwächt behauptet. (In anderen Versuchen wurde zwar zuweilen eine etwas grössere Inaktivierung konstatiert).

Dagegen ist aus diesem Versuch auch ersichtlich, dass der zur Trockne gedampfte Extrakt einen Teil seiner Wirkung bei dieser Behandlung eingebüsst hat. Dabei muss in Betracht gezogen werden,

TABELLE 12.

Versuch: 20-12-38.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 Extrakt I oder dest. Wasser.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: 0.390 g Trockenmyzel (Kultur: 20/5—11/6/38) in 20 cm^3 dest. Wasser extrahiert.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	35.5	126	131	149
2	Extrakt, aufgekocht	36.6	181	183	198
3	Extrakt, 2 × autoklaviert	36.0	179	180	200
4	Extrakt, eingedämpft und wieder gelöst	35.5	167	156	176

dass der frisch-hergestellte wässerige Extrakt, auch nach dem Zentrifugieren (max. 2000 Touren pro Minute) keine völlig klare Lösung, sondern eine feine Suspension darstellt, in der die Teilchen sich nur sehr langsam absetzen. Beim Eindämpfen bilden diese unlöslichen Teilchen ein dünnes Häutchen, das nach der Wiederlösung des Extrakts im Eindampfschälchen zurückbleibt. Es wäre nun denkbar, dass ein Teil der atmungsaktiven Stoffe, denaturiert oder nicht, sich in diesem Häutchen befand. Es ist also möglich, dass entweder das wirksame Prinzip durch Wasserentziehung oder durch Umwandlung bei Erhitzung im trocknen Zustand seine Wirkung teilweise irreversibel verliert, oder dass der Aktivitätsverlust beim Eindämpfen durch Einschliessung oder Bindung eines Teils der fraglichen Stoffe in der unlöslichen Fraktion verursacht wird.

f. *Löslichkeit in Äthylalkohol.* Die Löslichkeit der atmungsaktivierenden Stoffe in absolutem Äthylalkohol und in 71 %igem Äthylalkohol, im Vergleich zu der in Wasser, geht hervor aus dem in *Tabelle 13* erwähnten Versuch.

Gleichgrosse Mengen des Trockenmyzels wurden mit Alkohol (100 % oder 71 %) oder mit Wasser extrahiert. Die Extrakte wurden alle auf dem Wasserbad zur Trockne verdampft und dann in dest. Wasser gelöst. Der wässerige Extrakt war klar (vom unlöslichen Häutchen abgesehen), mit einer braungelben Farbe, während der mit absolutem Alkohol hergestellte Extrakt klar und farblos und der mit

TABELLE 13.

Versuch: 10-1-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: je ½ g Trockenmyzel 1 Stunde extrahiert in dest. Wasser, abs. Alkohol oder 71 %igem Alkohol, zentrifugiert, eingedämpft, gelöst in 5 cm^3 dest. W.

Ge-fäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten St.			
		1. Stunde	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	65.0	106	114	123	131
2	wäss. Extrakt	65.6	131	129	139	149
3	abs. Alk. Extrakt	68.3	125	120	131	135
4	„ „ „	67.3	127	125	132	138
5	71 % Alk. Extrakt	61.3	142	140	149	152
6	„ „ „	68.4	142	140	147	152

71 %igem Alkohol bereitete Extrakt gelb und schwach getrübt war, mit einem Niederschlag am Boden.

Beim Vergleich der Ergebnisse in Tab. 13 zeigt es sich sofort, dass der 71 %ige Alkoholextrakt die kräftigste Wirkung auf die Atmung ausübt; der wässerige Extrakt folgt an zweiter Stelle und die Wirkung des 100 %igen Alkoholextrakts ist noch bedeutend schwächer. Die Löslichkeit der wirksamen Stoffe in diesen Lösungsmitteln lässt sich somit wie folgt abstufen: 71% Alkohol > Wasser > 100 % Alkohol.

g. *Löslichkeit in Äther und in Chloroform.* Mit Rücksicht auf nachher zu erwähnende Versuche war es wichtig zu ermitteln, ob das wirksame Prinzip löslich oder unlöslich in Diäthyläther ist. Dazu wurde Myzelpulver im Soxhlet-Apparat mit peroxyd-freiem Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde eingedämpft und in dest. Wasser gelöst. Der ätherunlösliche Rückstand wurde, nach Entfernung der Ätherreste, in dest. Wasser extrahiert. Beide Extrakte wurden in einigen Verdünnungen im Atmungsversuch auf ihre Wirkung untersucht.

Wie *Tabelle 14* zeigt, übt die ätherlösliche Fraktion nur eine geringe Wirkung aus, im Vergleich zu der ätherunlöslichen Fraktion. Aus diesem Versuch lässt sich also folgern, dass das wirksame Prinzip höchstens eine geringe Löslichkeit in Äther aufweist. In diesem Falle war von einer relativ sehr grossen Menge Pilzmaterial (1.75 g) aus-

TABELLE 14.

Versuch: 17-8-38.
Hauptraum: 350 Schn. v. ½ mm, „Muizen", annähernd gleich auf 7 Gefässe verteilt, in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.6 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: 1.75 g Trockenmyzel mit Äther extrahiert, ätherlöslicher Teil eingedämpft und gelöst in 5 cm^3 dest. Wasser; Rückstand extrahiert in 5 cm^3 dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff mm³/Stunde 1. Stunde	in Proz. d. ersten Stunde 2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	durchschn. 99.2 mm³ pro 60 Schnitten	112	123	128
2	ätherlösl. Fraktion unverdünnt		144	130	128
3	„ „ „ Verd. 1 : 3		130	127	141
4	ätherunlösl. Fraktion unverdünnt		168	160	153
5	„ „ „ Verd. 1 : 5		167	169	189

TABELLE 15.

Versuch: 23-12-38.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: 1 g Trockenmyzel (Kultur: 31/10—21/11/38) in 20 cm^3 dest. Wasser extrahiert; ein Teil des Extrakts umgeschüttelt mit Äther, ein anderer Teil mit Chloroform; die äther- und chloroformunlöslichen Fraktionen eingedämpft und wieder gelöst in dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff mm³/Stunde 1. St.	in Proz. d. ersten Stunde 2.	3. Stunde
1	dest. Wasser	51.7	108	130
2	Extrakt I, unbehandelt	52.6	154	165
3	„ , m/Äther umgeschüttelt	54.8	133	150
4	„ , m/Chloroform umgeschüttelt	48.8	139	150

gegangen, dessen beide Fraktionen in nur 5 cm^3 dest. Wasser gelöst wurden. Die Konzentration der atmungsaktivierenden Stoffe in der ätherunlöslichen Fraktion musste somit ausserordentlich hoch gewesen sein. Merkwürdigerweise rief diese Fraktion im unverdünnten Zustand keine besonders grosse Atmungserhöhung hervor, sondern zeigte einen rückläufigen Effekt, der auf das sekundäre Auftreten einer Hemmung hinweisen dürfte.

Vielleicht hatten die wirksamen Stoffe in dieser hohen Konzentration einen schädigenden Einfluss. Die Wirkung des verdünnten Extrakts (1 in 5) war allerdings nicht beeinträchtigt und überstieg diejenige der unverdünnten Flüssigkeit. Ähnliche Hemmungseffekte mit hohen Extraktkonzentrationen wiederholten sich auch in einigen anderen Fällen.

Aus einem weiteren Versuch (*Tabelle 15*), in dem der wässerige Extrakt mit Äther oder mit Chloroform umgeschüttelt wurde und die nicht in Äther oder in Chloroform löslichen Fraktionen durch Eindämpfen von Äther- und Chloroformresten befreit worden waren, stellte sich heraus, dass jedenfalls ein grösserer Teil der wirksamen Stoffe in der wässerigen Lösung hintergeblieben war (ein anderer Teil wird beim Eindämpfen verloren gegangen sein).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die atmungsaktivierenden Substanzen im Extrakt I nicht oder nur in geringem Masse in Äther und in Chloroform löslich sind.

h. *Aktivität nach Veraschung.* Um fest zu stellen, ob die Wirkung des Extrakts auf die Anwesenheit organischer Verbindungen und nicht etwa auf Spuren eines schweren Metalls zurückzuführen war, wurde der Extrakt, sowohl wie das Pilzmyzel im Platintiegel geglüht und die Asche mit Hilfe von Salpetersäure gelöst. Diese Lösung wurde zur Trockne gedampft, die Rückstände wurden in. dest. Wasser gelöst und im Atmungsversuch getest.

Aus *Tabelle 16* geht klar hervor, dass die Wirkung der fraglichen Stoffe auf die Atmung nach Veraschung vollständig verschwunden ist und dass somit von einer etwaigen Wirkung schwerer Metalle in dieser Hinsicht nicht die Rede sein kann.

i. *Adsorption an das Seitz-Filter und an Kohle.* Vorläufige Versuche zeigten, dass der Extrakt nach Filtrierung durch ein Seitz-Asbestfilter den grössten Teil seiner Wirkung eingebüsst hatte. Zur Herstellung steriler Extrakte war dieses Filtrierungsverfahren daher ungeeignet, aber der Befund, dass ein Teil der atmungsaktivierenden Stoffe von dem Filter adsorbiert wird, war indessen von grosser Bedeutung, da er einen Weg eröffnete zur Anreicherung und Trennung der fraglichen Substanzen. Es erwies sich bald, dass das wirksame Prinzip auch von aktiver Kohle leicht adsorbiert wird.

TABELLE 16.

Versuch: 24-1-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: Gefäss 4 — 0.5 g Trockenmyzel verascht und gelöst in 5 cm^3 dest. Wasser;
Gefäss 5 — 0.5 g Trockenmyzel in 20 cm^3 72 %igem Alk. extrahiert, zentrifugiert, eingedämpft und gelöst in 5 cm^3 dest. Wasser;
Gefässe 6 u. 7 — 1 cm^3 dieses Extrakts verascht und gelöst in 1 cm^3 dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff		
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten St.	
		1. St.	2.	3. St.
1	dest. Wasser	67.6	104	113
2	„ „	68.7	106	117
3	„ „	69.3	106	119
4	veraschtes Myzel	67.7	109	118
5	Extrakt I, nicht verascht	64.5	144	145
6	„ , verascht	60.4	107	118
7	„ , „	67.2	104	112

TABELLE 17.

Versuch: 1-11-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: 0.585 g Trockenmyzel (Kultur: 20/5—11/6/38) in 30 cm^3 dest. Wasser extrahiert, zentrifugiert, teilweise durch sterile Seitz-Filter (K oder EK) filtriert, Rest aufgekocht.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff		
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten St.	
		1. Stunde	2.	3. St.
1	dest. Wasser	40.7	90	118
2	Extrakt I	40.0	180	175
3	„ , Seitz K-filtriert	37.5	124	144
4	„ , Seitz EK-filtriert	39.2	119	130

Seitzfilteradsorption. Die Adsorbierbarkeit dieser Stoffe an das Seitz K-Filter (Klärungsfilter) und an das Seitz EK-Filter (Entkeimungsfilter) wurde verglichen. Aus dem Versuch (*Tabelle 17*) ist ersichtlich, dass das feinere EK-Filter die atmungsaktivierende Wirkung des Extrakts am stärksten verringert und somit eine höhere Adsorptionstätigkeit als das K-Filter besitzt.

Dass die Inaktivierung des Extrakts tatsächlich auf Adsorption der wirksamen Stoffe beruht, wird im folgenden Versuch nachgewiesen, in dem es gelang diese Stoffe vom Filter abzutrennen und dieselben wieder in aktivem Zustand in der Lösung zurückzugewinnen (*Tabelle 18*). Die Elution erfolgte mit Aceton-Ammoniak (60 %-iges Aceton + 2.5 % Ammoniak, nach KÖGL u. TÖNNIS, 1936).

TABELLE 18.

1. Versuch: 15-8-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Muizen", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: Myzeldecken aus 10 Kolben (500-cm^3 Erlenmeijer mit je 40 cm^3 verdünnter RICHARDS-Lösung ($\frac{1}{2}$ ×), (Kultur 8/7—12/8/39), in 400 cm^3 dest. Wasser $\frac{1}{2}$ St. im Wasserbad extrahiert, filtriert. 100 cm^3 dieses Extrakts durch steriles Seitz EK-Filter filtriert.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten St.			
		1. Stunde	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	78.8	98	111	113	119
2	Extrakt I	78.7	126	123	122	126
3	„ , Seitz-filtriert	78.5	117	121	120	125

2. Versuch: 16-8-39.
Hauptraum, Birne, Einsatz und Vorbehandlung: wie oben.
Extrakt: wie oben, Seitz-Filterplatte mit 50 cm^3 Aceton-Ammoniak eluiert; Eluat eingedämpft und gelöst in 50 cm^3 dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten St.			
		1. Stunde	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	66.3	112	112	116	119
2	Extrakt I, Seitz-Eluat	64.7	136	127	130	132

Die Adsorption, die in diesem Falle erzielt wurde, war deswegen ziemlich gering, weil eine grössere Menge des Extrakts — 100 cm^3 — durch eine Filterplatte filtriert wurde. Die beschränkte Adsorptions-

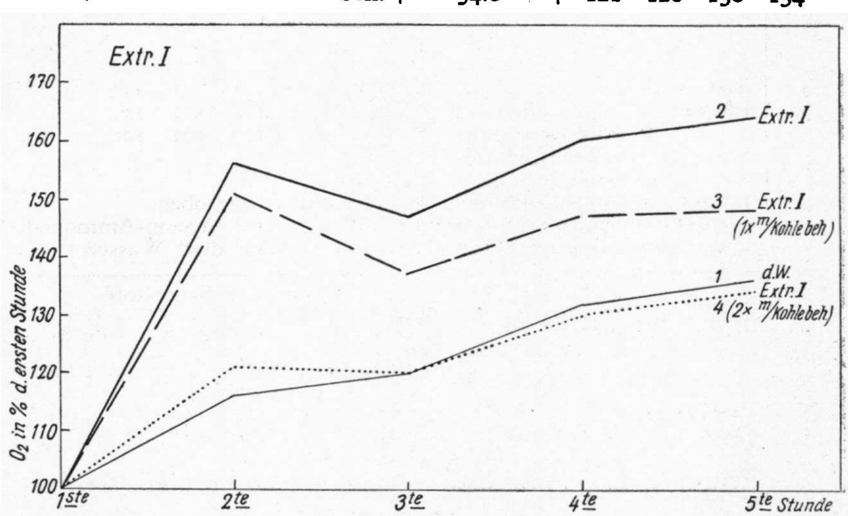
kapazität des Filters konnte die Flüssigkeit dabei nur teilweise inaktivieren.

Kohleadsorption. Eine quantitative Inaktivierung des Extrakts durch Behandlung mit Aktivkohle erfolgte nur mit grösseren Mengen

TABELLE 19. (s. Fig. 5).

Versuch: 27-10-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: 0.221 g Trockenmyzel (Kultur: 12/9—6/10/38) in 50 cm^3 dest. Wasser extrahiert, aufgekocht; ein Teil des Extrakts einmalig mit Aktivkohle (Carbo absorbens), ein anderer Teil zweimalig mit Kohle behandelt, zentrifugiert.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff mm³/Stunde 1. Stunde	in Proz. d. ersten St. 2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	50.4	116	120	132	136
2	Extrakt I	55.7	156	147	160	164
3	„ , 1 × m/Kohle beh.	54.7	151	137	147	148
4	„ , 2 × m/Kohle beh.	54.0	121	120	130	134



Figur 5, s. Tabelle 19.

Kohle oder erst nach wiederholter Kohlebehandlung (*Tabelle 19* und *Fig. 5*). Die Adsorbierbarkeit der aktiven Stoffe war auch hier reversibel.

Es zeigte sich, dass die Adsorption in alkoholischem Milieu erfolgreicher ist als im wässerigen Extrakt, während auch das Kohle-Eluat im ersten Falle eine bedeutend kräftigere Wirkung im Atmungsversuch aufweist (*Tabelle 20*).

TABELLE 20.

Versuch: 2-11-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: 0.390 g Trockenmyzel (Kultur: 20/5—11/6/38) in 20 cm^3 96 %igem Alkohol extrahiert, zentrifugiert;
die Hälfte eingedämpft, gelöst in 10 cm^3 dest. Wasser, mit ½ g Kohle (Carbo abs.) behandelt, zentrifugiert, Kohle mit Acet. Amm. eluiert, Eluat zentrifugiert, eingedämpft, gelöst in 5 cm^3 dest. Wasser;
die zweite Hälfte sofort mit ½ g Kohle behandelt, zentrifugiert, Filtrat eingedämpft und gelöst in 10 cm^3 dest.Wasser, Kohle mit Acet. Amm. eluiert, zentrifugiert, Eluat eingedämpft und gelöst in 5 cm^3 dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff mm³/Stunde	in proz. d. ersten St.	
		1. Stunde	2.	3. St.
1	dest. Wasser	40.4	118	129
2	Filtrat der Kohlebehandlung in wässeriger Lösung	41.0	130	128
3	*Eluat* der Kohlebehandlung in wässeriger Lösung	41.5	148	135
4	Filtrat der Kohlebehandlung in alkoholischer Lösung	40.3	125	129
5	*Eluat* der Kohlebehandlung in alkoholischer Lösung	40.6	177	176

Nicht nur an Tierkohle (Carbo absorbens), sondern auch an Noritkohle kann das wirksame Prinzip adsorbiert werden. Neben Aceton-Ammoniak wurde auch Pyridin-Methylalkohol (nach ORLA-JENSEN, 1936) in einigen Fällen mit Erfolg als Elutionsmittel benutzt.

j. *Extrakt aus Myzelien, gebildet in durchlüfteter und in nichtdurchlüfteter Kultur.* Nachdem festgestellt worden war, dass die atmungsaktivierenden Stoffe vom Pilz in Reinkultur gebildet werden, lag es nahe zu untersuchen in welchem Masse die Bildung dieser Stoffe von den Kulturbedingungen beeinflusst wurde. In diesem

Zusammenhang wurde die Aktivität des in aerobem Milieu gebildeten Pilzmyzels verglichen mit der des unter ziemlich anaeroben Verhältnissen gewachsenen Pilzmaterials.

Das Ausgangsmaterial für die übliche Extraktherstellung wurde, wie oben erwähnt, in Kolben in einer dünnen Schicht der Nährlösung gezogen. Unter diesen aeroben Bedingungen zeigte der Pilz ein schnelles Wachstum. Im zuckerreichen Milieu tritt auch Gärung auf — das Gärungsvermögen der Fusarien ist neben dem der Sprosspilze allgemein bekannt — und diese Eigenschaft ermöglicht offenbar dem Pilz in submersen, also in ziemlich anaeroben Umständen ein gewisses Wachstum. Um zu ermitteln ob die Bildung der wirksamen Stoffe mit den Atmungsbedingungen des Pilzes — und eventuell mit dessen Stoffwechselmechanismus — im Zusammenhang gebracht werden könnte, wurde folgender Versuch angestellt.

Zwei 750-cm³ Erlenmeijerkolben, die je 600 cm³ sterile RICHARDS-Nährlösung enthielten, wurden mit 5 cm³ einer Sporensuspension von *Gibberella Saubinetii* geimpft. Einer der Kolben wurde mittels eines fein ausgezogenen Glasrohrs, das bis an den Boden reichte und durch das, via eine Druckflasche und ein steriles Wattenfilter, ein stetiger Luftstrom gepumpt wurde, durchlüftet. In dem anderen Kolben, der ruhig stehen blieb, wuchs der Pilz, ausgenommen an der kleinen Oberfläche, unter nahezu anaeroben Bedingungen.

Der erste Kolben lieferte in 9 Tagen eine Ausbeute von 1.120 g Trockenmyzel, während der andere, in dem das Wachstum langsamer erfolgte, in 17 Tagen 1.163 g produzierte.

Extrakte wurden aus gleichen Gewichtsmengen Trockenmyzel hergestellt. Aus *Tabelle 21* geht hervor, dass die von beiden Extrakten hervorgerufene Atmungserhöhung im Anfang nahezu gleich war, nämlich etwa 55—60 % über der Kontrolle (dest. Wasser). Im weiteren Verlauf des Versuchs zeigte sich jedoch ein kleiner Unterschied, dadurch, dass der Effekt des Pilzmyzels aus der nicht-durchlüfteten Kultur in 4 Stunden bis auf die Hälfte zurücklief, während die Erhöhung der Atmung durch den Extrakt aus der durchlüfteten Pilzkultur nur auf $^3/_4$ oder $^4/_5$ der ursprünglichen Zahl (über dem Kontrollewert) herabsank.

In späteren Versuchen wird dargelegt werden, dass in Reinkultur nicht nur atmungsaktivierende, sondern auch atmungshemmende Stoffe gebildet werden können. Der starke Rückgang der Atmungserhöhung im ersten Falle könnte vielleicht der Bildung solcher hemmenden Faktoren in der nicht-aerierten Pilzkultur zugeschrieben werden.

TABELLE 21.

Versuch: 21-4-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm³ dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm³ KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: 1 g Trockenmyzel in 10 cm³ dest. Wasser autoklaviert, abzentrifugiert.
Durchlüftete Kultur: 17/1—26/1/39.
Nicht-durchlüftete Kultur: 17/1—3/2/39.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm³/Stunde	in Proz. d. ersten St.			
		1. Stunde	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	47.7	104	119	118	135
2	Extrakt I, aus durchl. Kult.	50.0	164	172	168	179
3	id.	44.2	158	170	166	178
4	Extrakt I, aus nicht-durchl. Kult.	47.1	165	169	157	167
5	id.	47.3	164	168	158	165

Wenn auch die Durchlüftung der Nährflüssigkeit zur Erzielung einer guten Ernte zu bevorzugen ist, so übt sie jedenfalls keinen grossen Einfluss auf den Gehalt des Pilzmyzels an atmungsaktivierenden Stoffen aus.

k. *Wirkung auf die Atmung von Gewebezylindern.* Den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit bildete die in Absch. IV dargelegte Atmungserhöhung infizierter Gewebezylinder. Die Wirkung des Myzelextrakts auf die dünnen, gewässerten Gewebeschnitten wurde im vorhergehenden festgestellt und die Frage warf sich auf in welchem Masse auch die Atmung grösserer Gewebeteile, wie Kartoffelzylinder, auf diesen Einfluss reagieren würde.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde von mehreren frischgeschnittenen Gewebezylindern zunächst die Atmungsgrösse festgestellt. Sodann wurde ein Teil der Zylinder 10 Minuten im Extrakt I untergetaucht, während die anderen sich in dieser Zeit in sterilem dest. Wasser befanden. Nach Ablöschen der anhängenden Flüssigkeit mittels sterilen Filtrierpapiers wurde der Atmungsversuch mit denselben Zylindern fortgesetzt (*Tabelle 22*).

In diesem Versuch kamen Zylinder aus verschiedenen Teilen der Knolle — nämlich innerhalb und ausserhalb des Gefässbündelringes ausgeschnitten — zur Anwendung und deswegen war die Anfangs-

TABELLE 22.

Versuch: 18-1-39.
Hauptraum: 1 cm^3 KOH 25 % und 2 cm^3 dest. Wasser.
Birne: leer.
Einsatz: Kartoffelzylinder („Eigenheimer"), frisch-geschnitten, 30 × 6 mm.
Extrakt: Myzelrückstände aus Versuch 10-1-39 (Tab. 13) in 30 cm^3 dest. Wasser extrahiert, abzentrifugiert, eingedämpft, ausgezogen mit 10 cm^3 80 %iger Alk., Niederschlag abzentrifugiert, Filtrat eingedämpft und gelöst in 15 cm^3 dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Ursprüngliche Lage d. Gewebes	Zylinder getaucht in	verbrauchter Sauerstoff			
			mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
			1. St.	2.	3.	4. St.
1	Markgewebe	dest. W.	37.3	87	108	102
2	„	Extrakt I	43.9	100	140	135
3	Innerh. d. Gefässbündelringes	dest. W.	47.9	85	94	90
4	Innerh. d. Gefässbündelringes	Extrakt I	46.5	106	134	141
5	Ausserh. d. Gefässbündelringes	dest. W.	54.4	80	93	94
6	Ausserh. d. Gefässbündelringes	Extrakt I	54.4	109	129	133

atmung der Zylinder ziemlich ungleich (s. auch Abschn. III-3b und Tab. 7).

Alle der Extraktwirkung ausgesetzten Zylinder zeigten, im Vergleich mit der Kontrolle, eine deutliche Zunahme der Atmungsgrösse. Der Effekt entwickelte sich langsamer, als bei Gewebeschnitten — die starke Erhöhung wurde erst in der dritten Stunde beobachtet — und dieser Befund weist darauf hin, dass die wirksamen Stoffe langsamer als in die Schnitten in die an der Atmung beteiligten Schichten der Zylinder hineindringen. Weil aus den Versuchen mit den dünnen Schnitten klar hervorgeht, dass die Wirkung des Extrakts nicht etwa auf eine Änderung der Gasdiffusionsgeschwindigkeit zurückzuführen war, ist die Annahme naheliegend, dass die nachträgliche Erhöhung der Atmung von der Beteiligung tieferliegender Zellschichten, in welche die aktivierenden Substanzen erst später hineindiffundierten, hervorgerufen wurde. Man muss hierbei bedenken, dass die Atmung dieser der Luft ausgesetzten und noch nicht verkorkten Gewebezylinder nicht durch mangelnden Sauerstoffzutritt auf die äussersten Zellschichten beschränkt ist, sondern dass auch ein Teil der tieferliegenden Zellen zu der „aktiv" atmenden Zone (s. Abschn. III-1) gehören.

l. *Wirkung auf die Atmung frischgeschnittener Scheibchen.* Im Vergleich zu den gewässerten Schnitten reagierte die Atmung der frischgeschnittenen Scheibchen weniger stark auf den Extraktzusatz, aber die Atmungssteigerung setzte im letzteren Falle ebenfalls schon in der ersten Stunde nach dem Einkippen des Extrakts ein.

TABELLE 23.

Versuch: 16-1-39.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Frisch-geschnittenes Gewebe.
Extrakt: 1 g Trockenmyzel (Kultur: 31/10—21/11/38) in 20 cm^3 80 %-igem Alkohol während 15 Minuten bei 80—90° C. extrahiert, abzentrifugiert, eingedämpft, gelöst in 5 cm^3 dest. Wasser (Trockengewicht: 14 mg/cm^3), verdünnt mit dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Zusatz	Verdünnungen	verbrauchter Sauerstoff			
			mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
			1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser		42.3	92	97	103
2	Extrakt I	1 : 10^2	40.9	98	109	114
3	„	1 : 10	43.9	112	118	121
4	„	unverdünnt	48.8	145	129	134

Diese Tatsachen sind ersichtlich aus *Tabelle 23.* Dieser Versuch ist zu vergleichen mit Versuch 5 in Tabelle 10, in dem derselbe Extrakt auf gewässerte Schnitten einwirkte. Die geringere Aktivierung der Atmung frischgeschnittener Scheibchen, die sich auch aus anderen Versuchen immer wieder ergab, kann nicht lediglich von einer geringeren Permeabilität der Zellen verursacht werden. In diesem Falle hätte der Effekt erst langsam hervortreten und nicht bereits in der zweiten Stunde — wie der Versuch zeigt — seinen Maximalwert erreichen müssen. Vielmehr sei unseres Erachtens die Erscheinung der physiologischen Disposition des frischgeschnittenen nicht-gewässerten Gewebes zuzuschreiben, bei der die potentielle Atmungskapazität offenbar einer Hemmung unterlegen ist, wie auch aus der niedrigen Atmungsgrösse der nicht-vorbehandelten gegenüber jener der gewässerten Schnitten hervorgeht.

m. *Bariumfällung.* Zucker haben einen gewissen Einfluss auf die Atmung. Dieser „Zuckereffekt" wird später noch erwähnt werden. Der Extrakt I zeigte allerdings eine negative Reaktion mit dem LUFFschen Reagens — dieses Reagens (SCHOORL, 1937) wurde statt

der FEHLINGschen Lösung zum Nachweis reduzierender Zucker gebraucht — und enthielt somit höchstens Spuren reduzierender Zucker (mit LUFFschem Reagens ergab eine 0.01 %ige reine Glukose-Lösung noch eine sichtbare Reaktion), so dass ein „Zuckereffekt" des Extrakts von vornherein bereits sehr unwahrscheinlich war.

Um diese Angelegenheit noch weiter sicher zu stellen wurde nach der Methode von BABA (1935) versucht, etwaige Zucker mit methylalkoholischem Bariumhydroxyd zu fällen.

Ba(OH)2 ist löslich in Methylalkohol, während die Barium-Saccharate bei Zimmertemperatur nicht oder nur schwer löslich sind. Mit Hilfe von Kohlensäure kann der Niederschlag zerlegt und der Zucker zurückgewonnen werden.

Trockenmyzel wurde mit 85%igem Methylalkohol extrahiert und der Extrakt mit einem Überschuss einer gesättigten, methylalkoholischen Bariumhydroxydlösung versetzt. Der ausgeschiedene Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit CO_2 in dest. Wasser zerlegt. Etwaige Zucker würden sich in dieser Flüssigkeit befinden. Im Atmungsversuch zeigte diese Fraktion jedoch keine Wirkung und ein „Zuckereffekt" unterblieb also auch hier. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Filtrat der Bariumfällung mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert. Es entstand ein Niederschlag von $BaSO_4$, der abzentrifugiert wurde. Das klare Filtrat wurde zur Trockne gedampft und in dest. Wasser gelöst. Es zeigte nur eine niedrige Wirkung (etwa 10 % Erhöhung) auf die Atmung, während die $BaSO_4$-Fällung, in dest. Wasser suspendiert, eine bedeutende Aktivität (30 bis 35 % Erhöhung) aufwies. Da eine reine $BaSO_4$-Suspension keinen Effekt hatte, liegt es nahe anzunehmen, dass das wirksame Prinzip grösstenteils vom $BaSO_4$-Niederschlag adsorbiert wurde. Versuche um es auszuwaschen hatten nur geringen Erfolg.

n. *Extrakte verschiedener Pilze.* Die bis jetzt erwähnten Ergebnisse wurden erzielt mit Myzelextrakten von *Gibberella Saubinetii.* Die wichtige Frage ergab sich, ob auch andere Pilze atmungsaktivierende Stoffe in ihren Myzelien enthalten. Zur Lösung dieses Problems wurden nicht nur eine Anzahl anderer Fusarien — und zwar vor allem diejenigen Fusarien, die als Parasiten der Kartoffelknolle bekannt sind — sondern auch zwei weniger verwandte Pilze, *Rhizoctonia solani* (ein bekannter Kartoffelparasit) und *Trichoderma lignorum* (ein allgemeiner Saprophyt, der auf lebendigem Kartoffelgewebe kein Wachstum zeigt), gewählt.

In *Tabelle 24* (s. Fig. 6) werden einige Versuche, die in verschiedenen Jahreszeiten angestellt wurden, zusammengefasst. Es erwies sich, dass die Myzelextrakte aller untersuchten Pilze eine deutliche Erhöhung der Kartoffelatmung herbeiführten. Der erste Versuch zeigt

TABELLE 24.

1. Versuch: 22-9-38.
   Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
   Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt 1 (Gefäss 2 — 0.2 cm^3 Extrakt I).
   Einsatz: 0.6 cm^3 KOH 25 %.
   Vorbehandlung: gewässert.
   Extrakte: Gefäss 2 —0.175 g Trockenmyzel v. *Gibb. Saub.*, Kultur: Richards 14/5—24/5/38.
   Gefäss 3 — 0.190 g Trockenmyzel v. *Gibb. Saub.*, Kultur: Knop-Zucker 25/7—7/9/38.
   Gefäss 4 — 0.305 g Trockenmyzel v. *Rhizoct. solani*, Kultur: Knop-Zucker 25/7—7/9/38.
   Gefäss 5 — 0.160 g Trockenmyzel v. *Trichod. lignorum*, Kultur: Knop-Zucker 25/7—7/9/38. Je extrahiert in 5 cm^3 dest. Wasser und abzentrifugiert.

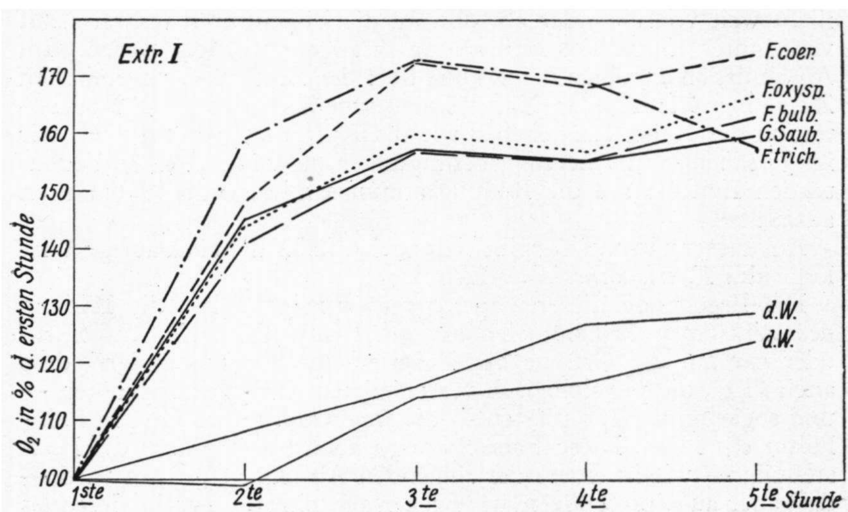
Gefäss Nr.	Zusatz		verbrauchter Sauerstoff			
	Pilzextr. von	Pilz gezogen auf	mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
			1. St.	2.	3.	4. St.
1	Kontrolle (dest. W.)		86.8	100	108	114
3	*Gibb. Saub.* (0.2 cm^3)	Richards	85.9	176	181	197
3	*Gibb. Saub.* (0.6 cm^3)	Knop-Zucker	87.5	164	178	183
4	*Rhizoct. sol.* (0.6 cm^3)	„ „	83.2	164	163	178
5	*Trichod. lign.* (0.6 cm^3)	„ „	86.5	156	167	179

2. Versuch: 20-4-39. (s. Fig. 6).
   Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
   Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
   Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
   Vorbehandlung: gewässert.
   Extrakte: 1 g Trockenmyzel (Kultur: 17/3—13/4/39) in 20 cm^3 dest. Wasser aufgekocht, dekantiert.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	44.5	99	114	117	124
2	„ „	41.7	108	116	127	129
3	Extr. I *F. coeruleum*	42.3	148	172	168	174
4	„ *F. bulb. var. lyc.*	46.0	141	157	155	163
5	„ *F. oxysporum f.* 1	43.8	144	160	157	167
6	„ *G. Saubinetii*	43.6	145	157	155	160
7	„ *F. trichothecioides*	42.1	159	172	169	158

3. Versuch: 11-8-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Muizen", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt I.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: 1 g Trockenmyzel in 20 cm^3 dest. Wasser, 15 Minuten aufgekocht, filtriert.
Gefäss 3 — Kultur: 8—31/7/39 auf verdünnter Nährlösung (1:2).
„ 4 — Kultur: 12/4—19/5/39.
„ 5 — Kultur: 8—31/7/39 auf verdünnter Nährlösung (1:2).
„ 6 — Kultur: 17/3—22/5/39.
„ 7 — Kultur: 20/5—4/6/38.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/ Stunde	In Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	78.5	101	107	113	118
2	„ „	69.2	105	112	116	122
3	Extr. I *F. trichothecioides*	73.0	151	145	141	139
4	„ „	76.5	152	151	139	135
5	„ *G. Saubinetii*	73.9	143	144	152	156
6	„ „	74.3	151	153	161	172
7	„ „	81.5	145	149	157	163



Figur 6, s. Tabelle 24 (2. Versuch).

die aktivierende Wirkung der Extrakte aus Myzelien von *Gibberella*, *Rhizoctonia* und *Trichoderma*, die auf zuckerhaltiger KNOPscher Nährlösung gezogen wurden. Daneben wird zur Vergleichung die Wirkung des üblichen *Gibberella*-Extrakts (Pilz auf RICHARDS-Lösung gezogen) demonstriert, von dem eine kleinere Menge (0.2 cm^3) einen grösseren Effekt aufwies, als 0.6 cm^3 des erstgenannten *Gibberella*-Extrakts. Die chemische Beschaffenheit des Nährbodens bildet somit eine der Kulturbedingungen des Pilzes, die auf die Produktion der atmungsaktivierenden Stoffe offenbar einen Einfluss ausüben.

Im zweiten Versuch kamen Extrakte aus gleichen Mengen Trockenmyzel verschiedener Fusarien zur Anwendung. Alle weisen eine deutliche Wirkung auf, obwohl die Effekte einigermassen auseinanderlaufen. In dieser Hinsicht erregt die Wirkung des *F. trichothecioides*-Extrakts besondere Aufmerksamkeit: die Erhöhung der Atmung (über die der Kontrolle) sank in den letzten 2 Versuchsstunden schnell bis etwa auf die Hälfte herab. Von dem auffallenden Verhalten dieses Extrakts wird in der zweiten Hälfte dieses Abschnitts noch die Rede sein.

Schliesslich werden im dritten Versuch die Extrakte mehrerer Kulturen von *Gibberella Saubinetii* und *Fusarium trichothecioides* verglichen. Auch in diesem Falle wurden gleiche Gewichtsmengen Trockenmyzel als Ausgangsmaterial verwendet. Die Leistungen der *Gibberella*- Extrakte, wie die der *F. trichothecioides*-Extrakte, weichen nicht weit von einander ab, obwohl die Pilzkulturen teilweise auf verdünnter RICHARDS-Nährlösung gezogen worden waren. Im Anschluss an die obige Bemerkung über den Einfluss der chemischen Zusammensetzung der Nährlösung, scheinen somit die Konzentration der Nährstoffe, ebenso wie die Kulturdauer und — wie wir im § j sahen — die Atmungsbedingungen des Pilzes, keinen bedeutenden Einfluss auf die Bildung atmungsaktivierender Substanzen auszuüben.

Aus diesem Versuch ergibt sich auch wieder die rückläufige Wirkung des *F. trichothecioides*-Extrakts.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen zeigen, dass die Bildung des wirksamen Prinzips sich keinesfalls auf *Gibberella Saubinetii* oder gar auf die Gruppe der Fusarien beschränkt, sondern dass auch Pilze, die physiologisch-verschiedenen Gruppen angehören — und sogar reine Saprophyten — die fraglichen Substanzen in Reinkultur enthalten. Diese Tatsache wird noch betont durch die Feststellung — wie in einem der folgenden Abschnitte gezeigt wird — dass auch aus Sprosspilzen, wie Bäckerhefe, ein atmungsaktivierendes Prinzip extrahiert werden kann.

Wir möchten daraus den Schluss ziehen, dass die Anwesenheit atmungsbefördernder Stoffe im Myzel unter den Pilzen eine allgemeine Erscheinung ist. Jedenfalls besteht keine direkte Verbindung zwischen der Bildung dieser Stoffe und den parasitären Eigenschaften eines Pilzes.

o. *Zusammenfassung*. 1. Der Myzelextrakt von *Gibberella Saubinetii* enthält Stoffe, welche die Atmung des Kartoffelgewebes (Scheibchen und Zylinder) erhöhen und zwar bis auf ein Niveau, das — wenigstens während der Versuchsdauer von einigen Stunden — ziemlich konstant bleibt.

2. Die Grösse dieser Erhöhung ist vom physiologischen Zustand des Kartoffelgewebes abhängig, aber Extrakte, aus gleichen Gewichtsmengen Trockenmyzel hergestellt, rufen, wenn gleichzeitig auf das Gewebe einer Knolle getest, einen nahezu gleichen Effekt hervor. Die Dauer der Reinkultur und das Alter des Trockenmyzels scheinen auf die Anwesenheit der atmungsaktivierenden Stoffe keinen wesentlichen Einfluss auszuüben.

3. Noch in starker Verdünnung verursacht der Extrakt eine Atmungssteigerung, sodass die aktiven Stoffe auch in geringen Konzentrationen wirksam sind.

4. Der Atmungsquotient des Kartoffelgewebes wird vom Extrakt nicht geändert: der erhöhte Sauerstoff-Verbrauch geht also mit einer in gleichem Masse gesteigerten Kohlensäure-Bildung zusammen. Die „Atmung" eines Gewebebreis wird durch Extraktzusatz nicht merklich erhöht. Diese Tatsachen weisen darauf hin, dass die beobachtete Steigerung des O_2-Verbrauchs tatsächlich auf eine Erhöhung der Atmung lebender, intakter Zellen zurückzuführen ist.

5. Blausäure, in einer Konzentration von 1 in 30.000, hemmt die Kartoffelatmung bis auf etwa ein Drittel. Der Extrakt übt auf diese Rest-Atmung keine Wirkung mehr aus. Es liegt auf der Hand anzunehmen, dass der Extrakt auf das Polyphenoloxydasesystem der Kartoffel einwirkt.

6. Das wirksame Prinzip ist in hohem Masse thermostabil. Beim Eindämpfen zu vollständiger Trockenheit auf dem Wasserbad geht jedoch ein Teil der Aktivität verloren.

7. Das wirksame Prinzip löst sich leichter in 70 %igem, als in absolutem Alkohol. Die Löslichkeit in Wasser nimmt eine intermediäre Stellung ein. In Diäthyläther und in Chloroform ist es höchstens in geringem Masse löslich.

8. Die Wirkung des Extrakts war nach Veraschung völlig verschwunden.

9. Die wirksamen Stoffe werden adsorptiv an die Seitz-Asbest-Filterplatte und an aktive Kohle gebunden. Durch Behandlung der

Adsorbate mit geeigneten Elutionsmitteln sind die aktiven Substanzen in der Lösung zurückzugewinnen.

10. Auf die Bildung der wirksamen Stoffe im Pilzmyzel übt die Durchlüftung der Nährlösung keinen bedeutenden Einfluss aus.

11. Durch Barium gefällte und mit Hilfe von Kohlensäure zerlegte Extrakte hatten keine Wirkung auf die Atmung.

12. Nicht nur die Atmung gewässerter, sondern auch frischgeschnittener Kartoffelscheibchen wird vom Extrakt erhöht, jedoch in geringerem Masse als erstere.

13. Auch der Myzelextrakt von 4 anderen Fusarien, von *Rhizoctonia solani* und von *Trichoderma lignorum* enthält atmungserhöhende Stoffe. Die Bildung dieser Stoffe beschränkt sich somit nicht spezifisch auf die parasitären Pilze.

2. Kulturfiltrate von *Gibberella Saubinetii* und von einigen anderen Fusarien (Extrakt II).

Es zeigte sich, dass, neben den Myzelien, auch die Flüssigkeiten, in denen *Gibberella Saubinetii* und andere Fusarien in Reinkultur gezogen waren, Stoffe enthalten, die eine gewisse Atmungssteigerung des Kartoffelgewebes herbeiführen können.

Die RICHARDS-Nährlösung hat zwar an sich, durch ihren Zuckergehalt, bereits eine atmungserhöhende Wirkung — die wir fernerhin als „Zuckereffekt" bezeichnen werden — und zur Feststellung einer Atmungserhöhung unter Einfluss der Kulturflüssigkeit musste daher erst bestimmt werden, in welchem Masse etwaige unverbrauchte Zucker an der beobachteten Steigerung beteiligt waren. In der Regel wurde die Reinkultur *nicht* solange fortgesetzt, bis aller Zucker (Glukose) verbraucht war, sodass die Kulturflüssigkeit noch eine deutliche LUFFsche Reaktion auf reduzierende Zucker aufwies. Man konnte daher einen gewissen Zuckereffekt erwarten und in den Atmungsversuchen wurde die Wirkung des Kulturfiltrats denn auch — solange es Zucker enthielt — mit der Wirkung der sterilen, nichtgeimpften Nährlösung als Kontrolle verglichen.

Es stellte sich heraus, dass die Kulturflüssigkeit immer einen grösseren Effekt als die RICHARDS-Nährlösung hervorrief, obgleich der Zuckergehalt der ersteren meistens nur ein kleiner Bruchteil der ursprünglichen 5 Prozent der Nährlösung betrug.

Die Kulturflüssigkeit (Extrakt II) zeigte somit eine Wirkung, die teilweise dem Zuckereffekt zugeschrieben werden konnte, aber anderenteils von Stoffen, die der Pilz während seines Wachstums gebildet und in der Kulturflüssigkeit ausgeschieden hat, herbeigeführt wird. Mit diesem Teil der Wirkung werden wir uns jetzt beschäftigen und in den folgenden Seiten eine Übersicht der wichtigsten Versuche, die mit Extrakt II angestellt wurden, geben.

a. *Adsorption an das Seitz-Filter und an Kohle.* In *Tabelle 25* werden die Ergebnisse eines Versuchs, aus dem mehrere Tatsachen hervorgehen, wiedergegeben. Erstens wird obige Mitteilung, dass der Einfluss des Extrakts auf die Atmung den Zuckereffekt der Kontrolle (RICH. Lösung) übersteigt, bestätigt. Ausserdem zeigt es sich, dass die Wirkung des Extrakts durch Seitz-Filtrierung und auch durch Kohle-Behandlung herabgesetzt wird. Hieraus ergibt sich die Adsorbierbarkeit der wirksamen Stoffe an das Filter und an Kohle.

TABELLE 25.

Versuch: 5-1-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 Rich. Lösung oder Extrakt II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Kulturflüssigkeit (Kultur 31/10—21/11/38) durch Papierfilter filtriert, aufgekocht. Ein Teil hiervon Seitzfiltriert; ein anderer Teil (10 cm^3) 2 Stunden mit 0.5 g Noritkohle behandelt und abzentrifugiert.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	Rich. Lösung	53.4	124	144	162
2	Rich. Lösung, Kohle-Filtrat	58.5	118	135	154
3	Extrakt II	61.0	135	161	181
4	Extrakt II, Kohle-Filtrat	56.5	107	125	138
5	Extrakt II, Seitz-Filtrat	53.0	125	140	159

Auch die RICHARDS-Lösung verliert durch Kohlebehandlung einen Teil ihres Effekts, aber diese Abnahme ist klein, im Vergleich mit der Inaktivierung der Kulturflüssigkeit. In diesem Versuch wurden relativ grosse Mengen Kohle angewandt und dies erklärt, dass auch ein Teil der Zucker aus der RICH. Lösung entfernt wurde. Die restierende Aktivität der Kohle- und Seitzfiltrate des Extrakts wird zweifelsohne grösstenteils dem Effekt der noch anwesenden, nicht-adsorbierten Zucker zugeschrieben werden können.

b. *Löslichkeit in Äther und in Chloroform.* Im Anschluss an die Versuche mit den äther- und chloroformlöslichen und -unlöslichen Teilen des Myzelextrakts wurden auch dieselben Fraktionen des Extrakts II auf ihre Wirkung geprüft.

TABELLE 26.

Versuch: 4-1-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 Rich. Lösung oder Extrakt II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Kulturflüssigkeit (Kultur: 31/10—21/11/38) durch Papier filtriert. 35 cm^3 dieses Filtrats eingeengt bis auf 7 cm^3 (Extr. II 5 ×). Andere Teile umgeschüttelt resp. mit Äther und mit Chloroform. Alle Fraktionen zur Trockne gedampft und gelöst in $^1/_5$ des ursprünglichen Volumens.
Rich. Lösung gleichfalls auf 5fache Konzentration eingeengt.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	Rich. Lösung (5 ×)	39.2	157	183	195	199
2	Extrakt II (5 ×)	38.9	167	228	248	258
3	Extrakt II, unbehandelt	42.7	141	173	191	197
4	Extr. II, chloroform-unlösliche Fraktion	43.3	156	197	228	238
5	Extr. II, chloroform-lösliche Fraktion	40.2	114	139	140	148
6	Extr. II, äther-unlösliche Fraktion	43.5	162	234	252	258
7	Extr. II, äther-lösliche Fraktion	40.7	118	139	148	149
8	Glukose 25 %	45.8	144	167	190	

Wie *Tabelle 26* zeigt, hatte sich nichts (oder nur sehr wenig) der atmungsaktivierenden Stoffe in Äther oder in Chloroform gelöst, während die äther- und chloroformunlöslichen Fraktionen weitaus den grössten Teil der Aktivität, im Vergleich mit der Wirkung des eingedämpften und konzentrierten Rohextrakts im Gefäss 2, beibehalten hatten. Auch das wirksame Prinzip der Kulturflüssigkeit ist also in diesen Lösungsmitteln nicht oder nur sehr wenig löslich.

Der Zuckereffekt der eingeengten RICHARDS-Nährlösung zeigte sich in dieser Versuchsreihe ausserordentlich hoch.

In Tabelle 26 haben wir auch noch das Ergebnis eines Versuchs aufgenommen (Gefäss 8), das am nächsten Tag mit Kartoffelmaterial aus derselben Lieferung erzielt wurde und aus dem hervorgeht, dass ein Zusatz von 0.3 cm^3 25 %iger Glukose etwa eine gleich kräftige Wirkung wie die konzentrierte RICHARDS-Lösung — die ebenfalls etwa 25 % Glukose enthielt — ausübte.

Der Verlauf der Atmungskurven war in diesen Versuchen steiler

als gewöhnlich, was wohl auf einem Einfluss der Lagerbedingungen auf die Physiologie des Kartoffelmaterials beruhen dürfte. Die Unterschiede zwischen den Wirkungen der verschiedenen Zusätze blieben jedoch deutlich ersichtlich. Das Knollengewebe einer neuen Partie zeigte in folgenden Versuchen eine langsamere Steigerung der Atmungsgrösse in der Kontrolle.

c. *Filtrate durchlüfteter und nicht-durchlüfteter Kulturen.* Im ersten Teil dieses Abschnitts wurde festgestellt, dass der Extrakt aus Pilzmyzel, das unter ziemlich anaeroben Bedingungen gezogen worden war, pro Gewichtsmenge eine nahezu gleiche Aktivität als Extrakt I des aerob-gewachsenen Pilzmaterials aufwies.

TABELLE 27.

Versuch: 8-3-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 Rich. Lösung oder Extrakt II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Kulturflüssigkeiten durch Papier filtriert, autoklaviert (½ Stunde bei ½ Atm. Überdruck).
Durchlüftete Kultur: 17/1—30/1/39.
Nicht-durchlüftete Kultur: 17/1—3/2/39.
Beide in 750 cm^3-Kolben mit 600 cm^3 Nährlösung gezogen.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	Rich. Lösung	34.8	104	127	135
2	Extr. II, aus durchl. Kult.	38.8	131	171	175
3	„ „ „ „	43.8	121	148	157
4	Extr. II, aus nicht-durchl. Kultur	34.4	120	150	155
5	Extr. II, aus nicht-durchl. Kultur	37.0	119	141	152

Ein Versuch mit den Filtraten beider Pilzkulturen zeigte, dass auch diese Flüssigkeiten atmungsaktivierende Stoffe enthielten (*Tabelle 27*). Das Filtrat der durchlüfteten Kultur ergab zwar durchschnittlich einen höheren Effekt als das der nicht-durchlüfteten Kultur — die Einzelwerte variierten jedoch stark in diesem Falle — aber hierbei muss in Betracht gezogen werden, dass der Pilz in der erstgenannten Kultur ein schnelleres Wachstum aufwies. Das pH des Filtrats war 8.3 im Gegensatz zum pH 5.6 in der anaeroben Kultur. Die Anwesenheit einer kräftigeren Wirkung sagt in diesem

Falle somit nichts aus über das Mass, in dem die aktiven Substanzen gebildet werden. Es kommt uns vielmehr vor, dass die Durchlüftung auch auf das Ausscheiden atmungsaktiver Stoffe in die Kulturflüssigkeit keinen bedeutenden Einfluss hat.

d. *Schnelle Bildung der aktiven Stoffe in Reinkultur.* Der nächste Versuch (*Tabelle 28*) demonstriert die Tatsache, dass das wirksame Prinzip bereits im Anfangsstadium der Pilzkultur an die Kulturflüssigkeit abgegeben wird.

TABELLE 28.

Versuch: 24-3-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 Rich. Lösung oder Extrakt II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: 3 Tage gewässert.
Extrakte: Kulturflüssigkeit (Kultur: 17—22/3/39), zweimal durch Papier steril filtriert; teilweise aufgekocht.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	Rich. Lösung	47.8	116	127	134
2	„ „	46.9	114	126	132
3	Extrakt II	47.6	134	148	155
4	„ „	47.7	138	153	161
5	Extrakt II, erhitzt	48.3	136	144	143
6	„ „ „	45.8	136	147	148

Das Filtrat einer 5 Tage alten Kultur zeigte schon einen deutlichen Effekt. Es ist somit unwahrscheinlich, dass die fraglichen Stoffe Autolyse-Produkte darstellen oder zu den toxischen Stoffen gehören, die allmählich in vielen Pilzkulturen gebildet werden und die, zusammen mit der Erschöpfung der Nährstoffquelle, den sogenannten „Staling-Effekt" hervorrufen (PRATT, 1924). „Staling" tritt, nach PRATT, in älteren Fusarien-Kulturen auf, die, auf RICHARDS-Nährlösung gezogen, schliesslich eine alkalische Reaktion und Nährstoffmangel aufweisen. Sie fand, dass Kaliumbicarbonat in bedeutender Menge im „staling" Medium anwesend ist und dass dieser Stoff einen starken „Staling-Effekt" ausübt. Das pH der Kulturflüssigkeit wurde im vorliegenden Versuch nicht ermittelt, aber es war ohne Zweifel noch nicht weit über das Anfangs-pH (etwa 4.0) hinausgestiegen.

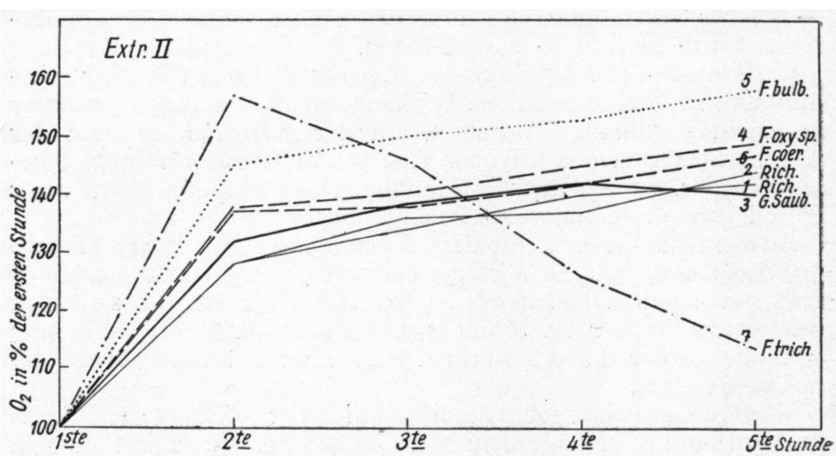
Die Erhitzung des Extrakts führte eine kleine Herabsetzung des Effekts herbei. Diesmal kann sie dem Abtöten der Pilzsporen, die

das Filter passierten und im Rohextrakt zurückblieben, zugeschrieben werden. Die Atmungssteigerung durch den unerhitzten Extrakt umfasste dann die geringe, aber steigende Atmung der keimenden Sporen. Jedenfalls geht schon aus diesem, wie aus den vorhergehenden Versuchen, die *Thermostabilität* des wirksamen Prinzips im Extrakt II hervor.

TABELLE 29. (s. Fig. 7).

Versuch: 19-4-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 Rich. Lösung oder Extr. II verschiedener Pilze.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Kulturflüssigkeiten (Kultur: 17/3—13/4/39) durch Papier filtriert, autoklaviert (1 Stunde bei $^3/_4$ Atm. Überdruck).

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	Rich. Lösung	55.7	128	134	140	142
2	„ „	51.7	128	136	137	144
3	Extr. II *G. Saubinetii*	56.6	132	138	142	140
4	„ „ *F. oxysporum f.* 1	58.1	138	140	145	149
5	„ „ *F. bulb. var. lyc.*	58.1	145	150	153	158
6	„ „ *F. coeruleum*	58.9	138	138	142	147
7	„ „ *F. trichothecioides*	57.6	157	146	126	114



Figur 7, s. Tabelle 29.

e. *Extrakte verschiedener Fusarien.* Ebensowenig wie das wirksame Prinzip im Myzelextrakt, beschränkt sich die Atmungserhöhende Wirkung der Kulturflüssigkeit auf Pilzkulturen von *Gibberella Saubinetii.* Auch die Kulturfiltrate der 4 anderen im § n der ersten Hälfte dieses Abschnitts erwähnten Fusarien, alle auf RICH. Lösung gezogen, zeigten den genannten Effekt.

In *Tabelle 29* und *Fig. 7* werden die Ergebnisse eines Versuchs, in dem die Wirkung der Kulturfiltrate dieser Pilze mit der des *Gibberella*-Filtrats verglichen wurde, veranschaulicht. Es stellte sich heraus, dass die Effekte der anderen Extrakte den von *Gibberella* in diesem Falle noch überstiegen. Eine quantitative Vergleichung dieser Ergebnisse hat hier jedoch keinen Sinn, da die Wachstumsgeschwindigkeit der Pilze und demgemäss der Zuckergehalt in den verschiedenen Kulturen nicht gleich gross waren.

Auffallend ist die Weise, in der die Atmung auf den Zusatz vom *F. trichothecioides*-Filtrat reagiert. Die starke Atmungserhöhung fängt bereits in der dritten Stunde an zu sinken und das ganze Verhalten weist auf das sekundäre Auftreten einer Atmungshemmung hin. Ein ähnliches, wenn auch schwächeres Abfallen der Atmungskurve beobachteten wir schon beim Versuch mit dem Myzelextrakt dieses Pilzes (s. Tab. 24). In einem der folgenden Paragraphen werden wir noch eingehend auf diese Erscheinung zurückkommen.

Die Wirkung der meisten Extrakte stieg im vorliegenden Versuch nicht sehr hoch über die der Kontrolle hinaus. Wahrscheinlich hatte in diesem Falle teilweise eine Inaktivierung des wirksamen Prinzips infolge der lange fortgesetzten Autoklavierung bei hoher Temperatur — welcher Behandlung die Kulturflüssigkeiten versuchsweise unterzogen worden waren — stattgefunden.

f. *Aktivität nach Verdünnung.* Extrakt I hat in starker Verdünnung noch eine deutliche Wirkung auf die Atmung, besonders in einem bestimmten Lagerstadium der Kartoffel, in dem der Atmungsmechanismus offenbar eine starke Reaktionsfähigkeit besass. Leider wurden mit Verdünnungen des Extrakts II in dieser Periode keine Atmungsversuche angestellt.

Aus einem Versuch mit dem *F. trichothecioides*-Filtrat (*Tabelle 30*) ergab sich, dass die Wirkung bei Verdünnung schnell nachliess, etwa parallel dem Fallen des Zuckereffekts der RICHARDS-Lösung bei fortschreitender Verdünnung. Der Effekt der Nährlösung hatte etwa die Grösse der des fünfmal stärker verdünnten *F. trichothecioides*-Extrakts.

Weitere Versuchsergebnisse hinsichtlich der Wirkung des Filtrats in Verdünnung stehen nicht zur Verfügung. Wenn aus obigem alleinstehenden Versuch aber ein Schluss gezogen werden darf, so

TABELLE 30.

Versuch: 10-5-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm³ Rich. Lösung oder Extr. II *F. trichothecioides*.
Einsatz: 0.4 cm³ KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: Kulturflüssigkeit von *Fusarium trichothecioides* (Kultur: 12/4—2/5/39) durch Papier filtriert, aufgekocht, mit sterilem dest. Wasser verdünnt.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm³/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	75.1	106	108	105
2	Rich. Lösung unverdünnt	77.3	124	133	131
3	„ „ 1 : 5	77.7	115	120	117
4	„ „ 1 : 25	76.8	111	114	111
5	Extr. II *F. trich.*, unverd.	81.3	167	196	196
6	„ „ „ , 1 : 5	78.0	128	138	134
7	„ „ „ , 1 : 25	73.1	116	119	118

scheint der Extrakt II weniger als der Extrakt I in kleinen Konzentrationen wirksam zu sein. Die Frage wird jedoch verwickelt durch das Mitauftreten des Zuckereffekts und bedarf weiterer Daten zur endgültigen Lösung.

Die Hemmung des *F. trichothecioides*-Extrakts unterblieb in diesem Versuch. Wie später gezeigt werden soll, entsteht der hemmende Faktor erst in der Nährflüssigkeit älterer Kulturen.

g. *Das wirksame Prinzip ist nicht flüchtig*. Der Extrakt II, zur Trockne gedampft und wieder gelöst in destilliertem Wasser, hatte seine Aktivität grösstenteils beibehalten (s. Tabelle 26). Schon hieraus geht hervor, dass das wirksame Prinzip nicht zu den flüchtigen Stoffen gehört. In einigen Fällen wurde die Kulturflüssigkeit vollständig abdestilliert und das Destillat im Atmungsversuch geprüft. Wie aus *Tabelle 31* ersichtlich ist, zeigte weder das Destillat des *Gibberella*-Filtrats, noch das Destillat des *F. trichothecioides*-Filtrats eine atmungsaktivierende Wirkung. Diese Ergebnisse bestätigen somit, dass die wirksamen Stoffe nicht flüchtig sind. Die Destillate älterer Kulturen reagierten alkalisch und enthielten Ammoniak, wie die positive NESSLER-Reaktion zeigte.

h. *Bariumfällung*. Zur Beseitigung des störenden Zuckereffekts wurde der Extrakt II — wie der Extrakt I — mit methylalkoholischem Bariumhydroxyd versetzt. Dazu wurde die Flüssigkeit bei niedrigem Druck zur Trockne gedampft und der Rückstand mit

TABELLE 31.

Versuch: 3-5-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Kulturflüssigkeiten von *Fusarium trichothecioides* und von *Gibberella Saubinetii* (Kultur: 12/4—2/5/39) durch Papier filtriert; aufgekocht. Filtrat teilweise abdestilliert.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	55.2	110	110	129	125
2	Extr. II *F. trich.*, Filtrat	56.4	162	209	231	222
3	Extr. II *F. trich.*, Destillat	54.3	113	111	122	122
4	Extr. II *G. Saub.*, Filtrat	57.8	141	154	176	173
5	Extr. II *G. Saub.*, Destillat	55.6	112	113	123	122

reinem Methylalkohol geschüttelt. Die methylalkoholische Lösung wurde mit gesättigter methylalkoholischer Bariumhydroxydlösung versetzt, bis kein Niederschlag mehr auftrat. Die voluminöse Fällung wurde teilweise mit Kohlensäure, teilweise mit Schwefelsäure zerlegt, wobei die gefällten Zucker regeneriert wurden und wieder in die Lösung gelangten. Die gebildeten Bariumsalze ($BaCO_3$ und $BaSO_4$) wurden auf dem Filter resp. mit Aceton und mit heissem Wasser ausgewaschen und die Waschflüssigkeiten (nach Abdampfung des Acetons) den Filtraten zugefügt oder einzeln getest.

Das Filtrat der Bariumhydroxydfällung wurde mit Schwefelsäure neutralisiert und eingedämpft (zur Entfernung des Methylalkohols). Nachdem Wasser zugesetzt worden war, wurde die Flüssigkeit filtriert, der $BaSO_4$-Niederschlag mit heissem Wasser ausgespült und das Waschwasser dem Filtrat zugefügt. Die verschiedenen Fraktionen wurden im Atmungsversuch geprüft, nachdem sie mit destilliertem Wasser bis zum Ausgangsvolumen aufgefüllt worden waren.

Bei Betrachtung der Ergebnisse (*Tabelle 32*) muss berücksichtigt werden, dass der unbehandelte Extrakt II von *Gibberella Saubinetii* — in vorhergehenden Versuchen — eine mittlere Atmungserhöhung von 41 %, der Extrakt von *F. trichothecioides* eine von 84 % und die RICHARDS-Lösung eine von 23 % über die Kontrolle (dest. Wasser) hervorrief. Es stellte sich heraus, dass die zuckerhaltige methylalkoholunlösliche Fraktion noch eine beträchtliche Wirkung

TABELLE 32.

1. Versuch: 5-5-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm³ dest. Wasser oder Extr. II-Fraktionen.
Einsatz: 0.4 cm³ KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: Kulturflüssigkeit von *Gibberella Saubinetii* (Kultur: 12/4—2/5/39) durch Papier filtriert. Fraktionierung s. Text.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm³/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	61.5	111	120	121	124
2	Extr. II, methylalkohol-unlöslich	61.5	123	134	136	138
3	Extr. II, Bariumfällung, durch CO_2 zerlegt	60.4	137	146	149	153
4	Extr. II, Bariumfällung, durch H_2SO_4 zerlegt	60.7	135	146	148	153
5	Extr. II, Waschflüssigkeit des $BaCO_3$-Niederschl.	59.3	126	132	128	127
6	Extr. II, Waschflüssigkeit des $BaSO_4$-Niederschl.	61.3	123	130	126	127
7	Extr. II, Filtrat der Bariumfällung	57.1	125	130	131	135

2. Versuch: 9-5-39.

Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm³ dest. Wasser oder Extr. II-Fraktionen.
Einsatz: 0.4 cm³ KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: Kulturflüssigkeit von ***Fusarium trichothecioides*** (Kultur: 12/4—2/5/39) durch Papier filtriert. Fraktionierung s. Text.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm³/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	62.0	107	112	118	118
2	Extr. II, methylalkohol-unlöslich	59.0	127	137	148	157
3	Extr. II, Bariumfällung, durch CO_2 zerlegt	58.9	132	144	149	153
4	Extr. II, Bariumfällung, durch H_2SO_4 zerlegt	57.8	129	146	146	154
5	Extr. II, Filtrat der Bariumfällung	57.9	119	131	129	127

hatte (resp. etwa 14 % und 25 % Erhöhung für *Gibb.* und *F. trich.*).

Auch die nicht durch Barium gefällte, zuckerfreie Fraktion (negative LUFF-Reaktion) übte noch einen deutlichen Einfluss (resp. etwa 11 % und 14 %) aus, aber die kräftigste Wirkung wies die zerlegte Bariumfällung auf (resp. etwa 26 % und 29 %), wobei es wenig ausmachte, ob die Fällung durch CO_2 oder durch H_2SO_4 zerlegt wurde. Auch die Waschflüssigkeiten, die im *Gibberella*-Versuch einzeln getest wurden, zeigten noch einige Aktivität.

Namentlich der *F. trichothecioides*-Extrakt hatte bei der Fraktionierung einen grösseren Teil der Aktivität verloren, sei es infolge des wiederholten Eindämpfens oder durch Adsorption an die Bariumsalze.

Bei der Bariumbehandlung des Extrakts I zeigte ausschliesslich der $BaSO_4$-Niederschlag eine atmungserhöhende Wirkung, während die Bariumfällung im methylalkoholischen Milieu nach Zerlegung keine Wirkung ergab.

Im Gegensatz hierzu weist die zerlegte Bariumfällung des Extrakts II einen deutlichen Einfluss auf die Atmung auf. Diese Fraktion enthielt zwar alle im Methylalkohol gelösten Zucker, aber ihre Wirkung war höher als die der RICHARDS-Lösung. Hieraus darf geschlossen werden, dass ein Teil der wirksamen Stoffe, neben den Zuckern, in ihr anwesend war. Die beabsichtigte Trennung von Saccharaten und Stoffen, deren Wirkung nicht auf dem Zuckereffekt beruht, gelang also mit dieser Methode nicht.

In Hinsicht auf die mit Extrakt I gewonnenen Resultate liegt es nahe anzunehmen, dass auch im vorliegenden Falle das wirksame Prinzip teilweise durch Adsorption an Bariumverbindungen aus der Lösung entfernt wurde. Diesmal bereits durch die voluminöse Fällung der Bariumsaccharate — im zuckerarmen Extrakt I war diese viel weniger umfangreich — und nicht erst durch den Bariumsalz-Niederschlag beim Neutralisieren des Filtrats, wie im Falle des Myzelextrakts. Bei der Zerlegung der Bariumfällung soll dann ein Teil der wirksamen Stoffe wieder frei geworden sein.

i. *Zuckerfreier Extrakt.* Es gelang schliesslich eine aktive Kulturflüssigkeit zu erhalten, die frei von reduzierenden Zuckern war — ohne dass die Kultur sehr lange dauerte — und zwar dadurch, dass der Pilz in verdünnter Nährlösung gezogen wurde.

Nach vierwöchiger Kultur auf einer RICHARDS-Lösung, die auf ein Zehntel verdünnt worden war, zeigte das Filtrat keine LUFFsche Reaktion mehr, während es deutlich atmungserhöhend wirkte.

Aus *Tabelle 33* ergeben sich die Effekte der Kulturflüssigkeiten von *Gibberella Saubinetii*, die in Nährlösungen verschiedener Verdünnung gezogen worden war. Je nachdem die Lösung mehr ver-

TABELLE 33.

Versuch: 12-5-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser, Rich. Lösung oder Extr. II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Kulturflüssigkeiten (Kultur: 12/4—10/5/39) von *Gibberella Saubinetii*, auf verdünnten Rich. Lösungen gezogen, durch Papier filtriert, aufgekocht.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff mm³/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	68.1	106	113	110
2	Rich. Lösung, Verd. 1 : 2	67.8	117	126	128
3	„ „ „ 1 : 5	63.8	114	123	119
4	„ „ „ 1 : 10	64.8	116	120	119
5	Extr. II, Kultur auf Verd. 1 : 2	63.8	151	155	149
6	„ „ „ „ „ 1 : 5	71.3	137	141	132
7	„ „ „ „ „ 1 : 10	67.3	134	135	128

dünnt war, wies der Pilz ein geringeres Wachstum auf und war dementsprechend die Wirkung der Kulturflüssigkeit niedriger. In der Verdünnung 1 : 10 war der Nährboden nach der Kultur zuckerfrei; in den anderen Kulturen konnten nach 4 Wochen noch reduzierende Zucker nachgewiesen werden. In diesem Versuch wird die Wirkung atmungsaktivierender Stoffe des Extrakts II, zum ersten Mal mit Sicherheit von einem etwaigen Zuckereffekt getrennt, dargelegt.

j. *Elution der adsorbierten wirksamen Stoffe.* Oben wurde bereits die Adsorbierbarkeit des aktiven Prinzips an Kohle und an das Seitz-Filter erwähnt.

Wie beim Extrakt I konnten auch die atmungsbefördernden Stoffe der Kulturflüssigkeit durch Elution mit Aceton-Ammoniak wieder zurückgewonnen werden. Die folgenden Versuche (*Tabelle 34*) geben ein Beispiel der Adsorption und Elution der wirksamen Stoffe, die von *Gibberella Saubinetii* in verdünnten und unverdünnten Nährlösungen gebildet und ausgeschieden wurden.

Aus dem ersten Versuch geht hervor, dass das Kohle-Eluat der Kultur auf verdünnter Lösung (1 : 10) einen relativ grösseren Teil der Aktivität der Kulturflüssigkeit besitzt, als das Kohle-Eluat der Kultur im unverdünnten Milieu.

Wie die Wirkung der Kohle-Filtrate zeigt, war im letzteren Falle der grösste Teil der Aktivität in der Flüssigkeit zurückgeblieben. Es muss dabei in Betracht gezogen werden, dass das Filtrat der Kultur

TABELLE 34.

1. Versuch: 13-5-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extr. II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: Kulturflüssigkeiten von *Gibberella Saubinetii* (Kultur: 12/4—10/5/39), auf normaler und auf verdünnter Rich. Lösung gezogen, durch Papier filtriert, aufgekocht. Je 50 cm^3 der Filtrate dreimal mit 0.5 g Noritkohle 10 Minuten geschüttelt, Kohle abfiltriert und mit 30 cm^3 Aceton-Ammoniak während der Nacht eluiert. Eluat eingedämpft und in 50 cm^3 dest. Wasser gelöst.

Gefäss Nr.	Zusatz	LUFF-sche Reaktion	verbrauchter Sauerstoff mm³/Stunde 1. St.	in Proz. d. ersten Stunde 2.	3.	4. St
1	dest. Wasser		41.4	102	107	119
2	Extr. II, Kultur auf unverd. Lösung	+	41.9	137	155	171
3	id. id. Kohle-Eluat	+	41.4	111	122	138
4	id. id. Kohle-Filtr.	+	42.1	135	138	149
5	Extr. II, Kultur auf Verdünnung 1 : 10	—	45.1	125	139	150
6	id. id. Kohle-Eluat	—	39.8	111	120	138
7	id. id. Kohle-Filtr.	—	44.4	113	114	123

2. Versuch: 17-5-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extr. II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: Kulturflüssigkeit von *Gibberella Saubinetii* (Kultur: 12/4—10/5/39), auf verdünnter (1 : 5) Rich. Lösung gezogen, durch Papier filtriert, aufgekocht. 50 cm^3 des Filtrats zweimal durch Seitzfilter gepresst. Filter mit 50 cm^3 Aceton-Ammoniak eluiert. Eluat eingedämpft und in 50 cm^3 dest. Wasser gelöst.
Weitere 50 cm^3 des Filtrats zweimal mit 0.5 g Carbo absorbens 30 Minuten geschüttelt, Kohle abfiltriert und mit 50 cm^3 Aceton-Ammoniak eluiert. Eluat eingedämpft und in 50 cm^3 dest. Wasser gelöst. Eluate teilweise nochmals eingedämpft.

Gefäss Nr.	Zusatz	LUFF-sche Reaktion	verbrauchter Sauerstoff mm³/Stunde 1. St.	in Proz. d. ersten Stunde 2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser		69.1	97	106	109
2	Extr. II	+	63.7	133	142	142
3	„ „ Seitz-Eluat	—	65.8	131	134	133
4	„ „ Seitz-Eluat nach wiederh. Eind.	—	63.1	118	124	127
5	Extr. II Kohle-Eluat	+	62.2	135	139	138
6	„ „ Kohle-Eluat nach. wiederh. Eind.	+	65.3	118	128	129

auf unverdünntem Nährboden noch Zucker enthielt, während das andere frei von reduzierenden Zuckern war.

Der zweite Versuch ergibt den Effekt des Seitzfilter-Eluats neben dem des Kohle-Eluats. Die wirksamen Stoffe stammen in diesem Falle aus der Kultur auf der 1 : 5 verdünnten Nährlösung. Das Kohle-Eluat war aktiver als das Seitzfilter-Eluat und das erste reagierte schwach positiv, das zweite negativ auf das LUFFsche-Reagens. Nach wiederholter Eindämpfung auf dem Wasserbad sanken die Wirkungen der Eluate erheblich. Aus Kontrolle-Versuchen an andrer Stelle hatte sich inzwischen erwiesen, dass durch Elution mittels Aceton-Ammoniak aus ungebrauchten Seitzfilterplatten und frischer Kohle keine aktiven Stoffe frei wurden. Das Adsorptionsverfahren ist ohne Zweifel von grossem Interesse für die Reinigung der aktiven Substanzen. Im vorliegenden Falle betrug das Trockengewicht nach Eindämpfen von 10 cm^3 des Seitzfilter-Eluats nur noch 3 mg.

k. *Der hemmende Faktor des F. trichothecioides-Extrakts.* Bereits mehrmals ist auf das auffallende Verhalten der *F. trichothecioides*-Extrakte hingewiesen. Der Myzelextrakt (Extrakt I), sowohl als die Kulturflüssigkeit (Extrakt II) von *F. trichothecioides* rief nach der anfänglichen Erhöhung bald eine mehr oder weniger jäh fallende Atmungskurve hervor. Diese Erscheinung machte den Eindruck, als ob auf die Atmungserhöhung bald eine Atmungshemmung folgte.

In einigen anderen Versuchen mit dem *F. trichothecioides*-Extrakt unterblieb jedoch der Hemmungseffekt.

Die Frage in wiefern das atmungsaktivierende Prinzip mit der atmungshemmenden Wirkung verbunden war und weshalb diese nicht immer in der Kulturflüssigkeit von *F. trichothecioides* auftrat, wird im folgenden erörtert werden.

1. Zunächst wurde festgestellt (*Tabelle 35*), dass das Filtrat jüngerer Kulturen dieses Pilzes nur die atmungsaktivierende Wirkung zeigte, dass aber in älteren Kulturen der erwähnte Hemmungsfaktor gebildet wurde. Die Extrakte in diesem Versuch stammten aus einer Kulturreihe von *F. trichothecioides*, die teils nach 12, teils nach 20 und teils nach 37 Tagen abfiltriert wurde. Nur letzteres Filtrat rief die Herabsetzung der Atmung, die fernerhin als „Hemmungseffekt" bezeichnet wird, hervor.

Das pH der Kulturflüssigkeiten war nach 20- und 37-tägigem Pilzwachstum resp. 6.3 und 6.7; sie zeigten beide noch eine deutliche LUFFsche Reaktion. Der Hemmungseffekt tritt somit bereits hervor, ehe alle Zucker in der Kulturlösung verbraucht sind und bevor die Flüssigkeit alkalisch reagiert.

Es ergab sich später, dass nach schnellem Wachstum in den war-

TABELLE 35.

Versuche: 24-4, 2-5, 20-5-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 Extrakt II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Kulturflüssigkeiten von *Fusarium trichothecioides* (Kulturen: 12/4—24/4, 12/4—2/5, 12/4—19/5/39) durch Papier filtriert, aufgekocht.

Datum	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
24/4	Extr. II, 12-tägige Kultur	63.2	134	150	161	
2/5	„ „ 20-tägige Kultur	64.9	166	206	205	200
20/5	„ „ 37-tägige Kultur	65.5	167	179	161	157

men Sommermonaten und im verdünnten Milieu (RICH. Lösung 1 : 2) das hemmende Prinzip schon nach 11 Tagen in der Kulturflüssigkeit nachweisbar war, bei einem pH-Wert von 5.8 und positiver LUFFschen Reaktion.

2. Aus einem anderen Versuch (*Tabelle 36*) geht hervor, dass die hemmenden Stoffe das Seitzfilter passieren. Im vorliegenden Falle wurde die Kulturflüssigkeit nacheinander durch zwei Seitzfilter gepresst. Beide Filterplatten wurden einzeln eluiert und es erwies sich, dass die Eluate einen Teil der atmungsaktivierenden Stoffe enthielten ohne aber die hemmenden Substanzen, während das Seitz-Filtrat dieselbe Hemmung zeigte als der Ausgangsextrakt, jedoch auf einem niedrigeren Atmungsniveau anfangend.

Diese Tatsachen weisen schon darauf hin, dass die atmungsaktivierenden und -hemmenden Wirkungen auf verschiedene Substanzen zurückgeführt werden müssen, von denen die erstere — teilweise — vom Seitz-Filter zurückgehalten und adsorbiert wird und die zweite restlos filtrierbar ist. Wenn das Seitz-Filtrat darauf mit Kohle geschüttelt wurde, dann zeigte es sich, dass die hemmenden Stoffe von dieser zurückgehalten wurden. Das Kohle-Filtrat wies nur noch einen Teil der aktivierenden Wirkung auf, während das Kohle-Eluat den vollständigen Hemmungseffekt ergab, zusammen mit einem anderen Teil der aktivierenden Wirkung. Im Gegensatz zu dem atmungsbefördernden Prinzip, wird der atmungshemmende Faktor also an Kohle, aber nicht an das Asbestfilter adsorbiert. Die Adsorbierbarkeit an Kohle ist für diesen Faktor ausserdem grösser als die Adsorbierbarkeit der aktivierenden Stoffe an Kohle und an das Filter.

TABELLE 36.

Versuch: 22-5-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extr. II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: 2 Tage gewässert.
Extrakt: Kulturflüssigkeit von *Fusarium trichothecioides* (Kultur: 12/4—19/5/39) durch Papier filtriert, eine Stunde auf 70° C. erhitzt. 100 cm^3 des Filtrats nacheinander durch zwei Seitzfilter gepresst. Filter je mit 25 cm^3 dest. Wasser gewaschen, Waschwasser zusammengefügt. Filter je mit 75 cm^3 Aceton-Ammoniak eluiert. Eluate eingedämpft und gelöst in 50 cm^3 dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Zusatz	LUFF-sche Reaktion	verbrauchter Sauerstoff			
			mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
			1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser		66.8	103	112	109
2	Extr. II, erhitzt	+	68.0	155	158	140
3	„ „ Seitz-Filtr.	+	69.7	132	129	114
4	„ „ 1. Seitz-Eluat	—	63.0	129	140	136
5	„ „ 2. Seitz-Eluat	—	63.5	108	122	127
6	„ „ Seitz-Waschw.	+	64.9	116	117	106

3. In weiteren Versuchen gelang es den Hemmungsfaktor nahezu völlig vom aktivierenden Prinzip zu trennen. Mit Hilfe vom Seitz-Filter und von kleinen Mengen Kohle wurden Fraktionen erhalten, die entweder eine konstantbleibende Atmungserhöhung herbeiführten, oder nur einen Hemmungseffekt zeigten, ohne jede Erhöhung. Die Ergebnisse einer solchen Versuchsreihe gehen hervor aus *Tabelle 37*. Die Kulturflüssigkeit stammte aus einer *F. trichothecioides*-Kultur auf verdünnter RICHARDS-Lösung (1 : 2), in der nach 35 Tagen aller Zucker verbraucht und das pH hoch angestiegen (über pH 8.8) war.

Auch nach wiederholter Seitzfiltrierung (Sf und SfSf) gelang es in diesem Falle nicht, das atmungsaktivierende Prinzip in erheblichem Masse aus der Lösung zu entfernen. Das Ansäuern des Filtrats mittels Schwefelsäure, bis auf pH 6.5, änderte weder die Atmungsaktivierung, noch die Atmungshemmung des Extrakts wesentlich. Der Hemmungseffekt wurde jedoch restlos adsorbiert an eine kleine Menge Noritkohle, mit der das Seitz-Filtrat (Sf) nur kurze Zeit geschüttelt war: das *Filtrat* der Kohlebehandlung (SfCf) zeigte *eine konstantbleibende Erhöhung* der Atmung über die der Kontrolle, *ohne jeden Hemmungseffekt* (s. Fig. 8). Die Kohle wurde

TABELLE 37.

1. Versuch: 18-8-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Muizen", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extr. II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: Kulturflüssigkeit von *Fusarium trichothecioides* (Kultur: 8/7—12/8/39), auf verdünnter Rich. Lösung (1 : 2) gezogen, durch Papier filtriert. Nacheinander durch 2 Seitzfilter filtriert (Sf); ein Teil dieses Filtrats nochmals 2 × durch Seitzfilter (SfSf), ein zweiter Teil mit H_2SO_4 angesäuert bis auf pH 6.5 (Sf, anges.).

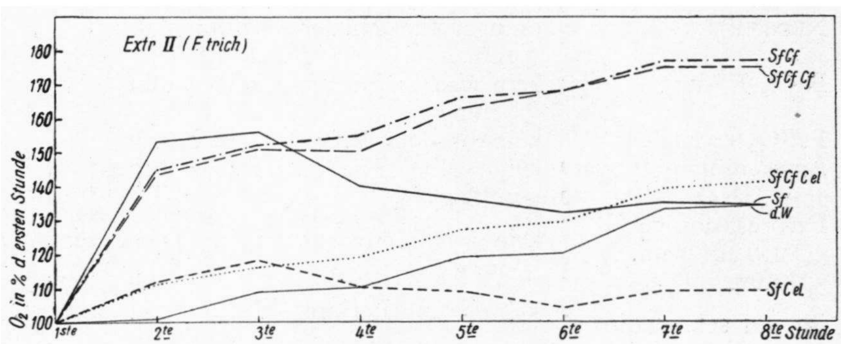
Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff mm³/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde				
		1. St.	2.	3.	4.	5.	6. St.
1	dest. Wasser	72.5	108	113	115	121	125
2	Extr. II — Sf	72.4	166	169	148	141	139
3	Extr. II — SfSf	72.4	160	163	142	134	129
4	Extr. II — Sf, anges.	74.8	159	161	145	137	131

2. Versuch: 22-8-39. (s. Fig. 8).
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Muizen", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extr. II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: 100 cm^3 des Seitz-Filtrats (Sf, s. 1. Versuch) mit 0.2 g Noritkohle 5 Minuten geschüttelt; Kohle abfiltriert, mit 50 cm^3 Aceton-Ammoniak eluiert, Eluat eingedämpft und gelöst in 50 cm^3 dest. Wasser (SfCel). Kohlefiltrat (SfCf) teilweise (50 cm^3) mit 0.5 g Noritkohle 30 Minuten geschüttelt, Kohle abfiltriert, mit 80 cm^3 Aceton-Ammoniak eluiert, Eluat eingedämpft und gelöst in 25 cm^3 dest. Wasser (SfCfCel). Zweites Kohlefiltrat = SfCfCf.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff mm³/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde						
		1. St.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8. St.
1	dest. Wasser	88.8	101	109	110	119	120	133	134
2	Extr. II — Sf	89.0	153	156	140	136	132	135	134
3	Extr. II — SfCf	88.6	145	152	155	166	168	177	177
4	Extr. II — SfCel	85.7	112	118	110	109	104	109	109
5	Extr. II — SfCfCf	87.8	144	151	150	163	168	175	175
6	Extr. II — SfCfCel	91.5	111	116	119	127	129	139	141

3. Versuch: 23-8-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Muizen", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne 0.3 cm³ dest. Wasser oder Extr. II.
Einsatz: 0.4 cm³ KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: 15 cm³ des ersten Kohle-Filtrats (SfCf, s. 2. Versuch) Seitzfiltriert (SfCfSf). 20 cm³ des ersten Kohle-Eluats (SfCel) gleichfalls Seitzfiltriert (SfCelSf).

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff					
		mm³/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde				
		1. St.	2.	3.	4.	5.	6. St.
1	dest. Wasser	81.7	101	110	114	116	118
2	Extr. II — SfCf	82.5	140	146	151	155	158
3	Extr. II — SfCfSf	83.2	108	116	120	120	125
4	Extr. II — SfCel	84.5	112	119	115	107	102
5	Extr. II — SfCelSf	81.3	105	108	106	101	97



Figur 8, s. Tabelle 37 (2. Versuch).

mittels Aceton-Ammoniak eluiert und das *Eluat* (SfCel) ergab, in doppelter Konzentration, nach einer kleinen Anfangserhöhung, den *Hemmungseffekt*, sodass die Atmungsgrösse nach 7 Stunden 25 % hinter jener der Kontrolle zurückblieb. Der kleine Rest der atmungsaktivierenden Stoffe konnte schliesslich durch Seitzfiltrierung des Kohle-Eluats endgültig entfernt werden (SfCelSf). In diesem Filtrat waren somit die atmungshemmenden Stoffe frei vom aktivierenden Prinzip wirksam.

Ein Teil des Kohle-Filtrats (SfCf) wurde nochmals mit Kohle geschüttelt — längere Zeit mit einer grösseren Menge — und filtriert (SfCfCf). Auch diese Kohle wurde eluiert, aber das Eluat (SfCfCel) zeigte nur einen Teil der aktivierenden Wirkung, ohne Hemmungs-

effekt. Dieser Befund bestätigt, dass die Hemmungsstoffe bereits vollständig durch die kleine Menge Kohle der ersten Kohleadsorption fortgerissen worden waren.

Das aktivierende Prinzip blieb im vorliegenden Falle auch nach der zweiten Kohleadsorption noch grösstenteils im Filtrat (SfCfCf) zurück. Erst Seitzfiltrierung einer kleinen Menge des ersten Kohlefiltrats (SfCf) vermochte die Flüssigkeit bedeutend zu inaktivieren (SfCfSf).

Möglicherweise beeinträchtigte das sehr hohe pH (> 8.8) in diesem Falle die Adsorption der atmungsaktivierenden Stoffe.

Die Kulturflüssigkeit (Sf) wurde auf folgende Weise geprüft:

Reaktion	*Ergebnis*	*Lösung enthält:*
LUFF	keine Bildung von rotem Kupferoxydul	keine reduz. Zucker
NESSLER	orangeroter Niederschlag	Ammoniak
$BaCl_2$-Lösung	kein weisser Niederschlag	kein Sulfat
$FeSO_4 + H_2SO_4$	kein brauner Ring	kein Nitrat
Ammoniummolybdat + HNO_3	kein gelber Niederschlag	kein Phosphat
Farbreaktion von RIMINI auf prim. Amine	keine rotviolette Färbung	keine prim. aliphat. Amine
id. auf sek. Amine	keine blaue Färbung	keine sek. aliphat. Amine

Die Kohle-Eluate enthielten ausserdem kein Ammoniak mehr. Mit dem NESSLERschen Reagens bildete sich eine grüngelbe Färbung, bald in eine weisse oder gelbe Fällung übergehend. Offenbar fielen hier organische Quecksilberverbindungen aus.

1. *Thermostabilität.* Oben haben wir bereits auf die Möglichkeit, dass ein Teil der Aktivität durch langewährende Autoklavbehandlung bei hoher Temperatur oder durch Eindämpfen auf dem Wasserbad verloren geht, hingewiesen. Im allgemeinen kann jedoch dem atmungsaktivierenden Prinzip des Extrakts II eine ziemliche Thermostabilität zugeschrieben werden. Diese Tatsache geht ausserdem noch aus den folgenden in *Tabelle 38* zusammengefassten Versuchen hervor.

Die Kulturflüssigkeit von *F. trichothecioides* zeigte in diesem Falle

TABELLE 38.

1. Versuch: 20-5-39 (Gefäss 6: 31-5-39).
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extr. II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: Kulturflüssigkeit von *Fusarium trichothecioides* (Kultur: 12/4—19/5/39), durch Papier filtriert. Teilweise eingedämpft und wieder gelöst in dest. Wasser, teilweise eine Stunde auf 70° C. erhitzt. Kleiner Teil autoklaviert (112°, ½ St.).

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	55.9	105	112	111	117
2	Extr. II, eingedämpft	59.0	175	187	169	163
3	„ „ „	55.7	173	185	170	161
4	Extr. II, erhitzt	65.5	167	179	161	157
5	„ „ „	60.4	160	169	155	152
6	Extr. II, autoklaviert	62.8	172	184	166	157

2. Versuch: 2-6-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extr. II.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: Kulturflüssigkeit von *Gibberella Saubinetii* (Kultur: 17/3—22/5/39), durch Papier filtriert, aufgekocht. Ein Teil autoklaviert (112°, ½ St.).

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	75.4	102	106	106	111
2	Extr. II, aufgekocht	73.2	162	166	165	165
3	Extr. II, autoklaviert	73.0	156	159	155	163

nach Eindämpfen (bei niedrigem Druck und niedriger Temperatur) und nach Autoklavierung sogar noch eine höhere Aktivität, als nach einstündiger Erhitzung auf 70° C.

Das *Gibberella*-Extrakt erfuhr durch die Autoklavbehandlung dagegen einen kleinen Aktivitätsverlust.

Der Hemmungseffekt des *F. trichothecioides*-Extrakts behauptete sich in allen Fällen und die fraglichen Stoffe werden also nicht durch Erhitzen oder Eindämpfen zerstört.

m. *Wirkung auf die Atmung von Gewebezylindern.* Zum Schluss sind noch die Versuche zu erwähnen, in denen statt Kartoffelscheibchen ganze Gewebezylinder zur Anwendung kamen. Wie bei den parallelen Versuchen mit dem Myzelextrakt, wurde erst die Atmungsgrösse der einzelnen Zylinder festgestellt. Sodann wurden sie eine halbe Stunde in die Flüssigkeit getaucht und darauf in die Atmungsgefässe zurückgebracht. In *Tabelle 39* ersieht man die Wirkung der Kulturfiltrate von *Gibberella Saubinetii* und von *Fusarium bulbigenum var. lycopersici*, im Vergleich zu dem Effekt der RICHARDS-Lösung. Letztere hatte eine starke Wirkung, die jedoch deutlich der Wirkung der Kulturfiltrate beider Pilze unterlegen war.

TABELLE 39.

Versuch: 30-3-39.
Hauptraum: 1 cm^3 KOH 25 % + 1 cm^3 dest. Wasser.
Birne: leer.
Einsatz: Kartoffelzylinder („Bintje"), frischgeschnitten, 30 × 6 mm.
Extrakte: Kulturflüssigkeiten von *F. bulbigenum var. lyc.* und *G. Saubinetii* (Kultur: 17—27/3/39), durch Papier filtriert, aufgekocht.

Gefäss Nr.	Zylinder (nach 1. Stunde) 30 Minuten getaucht in	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	Rich. Lösung	32.2	161	171	182
2	„ „	31.9	162	173	186
3	Extrakt II *F. bulbigenum var. lyc.*	34.7	174	188	208
4	„ „ „ „ „ „	32.5	181	195	219
5	Extrakt II *G. Saubinetii*	27.3	190	205	217
6	„ „ „ „	31.0	183	198	212

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch auf diese einfache Weise die Wirkung des Extrakts dargelegt werden kann.

n. *Zusammenfassung.* 1. Die Kulturfiltrate von *Gibberella Saubinetii* und von einigen anderen Fusarien, auf RICHARDS-Nährlösung gezogen, enthalten ein aktives Prinzip, das die Atmung des Kartoffelgewebes (Scheibchen und Zylinder) bis auf ein neues, sich während des Versuchs behauptendes Niveau steigert.

2. Diese Atmungserhöhung ist dem „Zuckereffekt" der sterilen Nährlösung deutlich überlegen.

3. Die wirksamen Stoffe der Kulturflüssigkeit werden vom Seitz-Asbestfilter, wie von aktiver Kohle adsorbiert, wenn auch nicht in sehr starkem Masse. Durch Elution mittels Aceton-Ammoniak können sie zurückgewonnen werden.

4. Das wirksame Prinzip ist nicht, oder nur sehr wenig, in Diäthyläther oder in Chloroform löslich.

5. Die Durchlüftung der Pilzkulturlösung ist nicht unbedingt notwendig für die Bildung der aktiven Stoffe und spielt hierbei wahrscheinlich nur insofern eine Rolle, als sie das Pilzwachstum befördert.

6. Die aktiven Stoffe bilden sich bereits innerhalb 5 Tage, also im Anfangsstadium der Pilzkultur. Es ist daher nicht wahrscheinlich, dass sie den toxischen Stoffen, die in älteren Kulturen zu dem „Staling-Effekt" beitragen, angehören oder mögliche Autolyse-Produkte des Pilzes darstellen. Im Einklang hiermit steht die Feststellung, dass die wirksamen Stoffe auftreten, bevor die gesamte Zuckermenge aus der Nährlösung verbraucht worden ist und das pH stark steigt.

7. Verdünnung des Extrakts setzt seine Wirkung ziemlich schnell herab.

8. Das wirksame Prinzip ist nicht flüchtig.

9. Es liess sich durch Bariumfällung der Zucker im Extrakt nicht von diesen Stoffen scheiden.

10. Durch Kultur auf verdünnter Nährlösung wurden schliesslich zuckerfreie Extrakte erhalten, die dennoch eine deutliche Aktivität aufwiesen.

11. Die Kulturflüssigkeit von *Fusarium trichothecioides* ruft, neben der schnell auftretenden aktivierenden Wirkung, einen langsamer hervortretenden Hemmungseffekt auf die Atmung hervor. Dieser Hemmungsfaktor bildet sich erst in älteren Kulturen. Er ist an Aktivkohle reversibel adsorbierbar, wird aber vom Seitzfilter nicht adsorbiert. Es gelang, den Hemmungseffekt völlig von der atmungsaktivierenden Wirkung zu trennen.

12. Beide Faktoren, der aktivierende, sowohl als der hemmende, sind in hohem Masse thermostabil.

ABSCHNITT VI.

DER EINFLUSS VON STOFFEN, IN PARASITISCHEN VERHÄLTNISSEN GEBILDET, AUF DIE ATMUNG DES KARTOFFELGEWEBES (EXTRAKT III).

Neben den im vorigen Abschnitt erwähnten Untersuchungen über die Wirkung von Stoffen, vom Pilz in Reinkultur gebildet, stehen die Versuche mit Extrakten aus infiziertem Kartoffelgewebe.

Steril geschnittene Kartoffelzylinder oder -scheiben dienten dabei *Gibberella Saubinetii* als lebendes Substrat. Die Extrakte, die aus diesem Komplex bereitet werden nachdem der Parasit das Gewebe befallen hat und ein üppiges Wachstum zeigt, enthalten offensichtlich Stoffe verschiedener Herkunft. Ein Teil der gelösten Stoffe stammt aus dem normalen lebenden Kartoffelgewebe; ein zweiter Teil rührt vom Pilzmyzel her. Ausserdem werden sich noch Substanzen aus dem vom Parasiten beeinflussten und veränderten Wirtsgewebe im Auszug vorfinden, sowie Stoffwechselprodukte des Pilzes.

Jede Gruppe kann möglicherweise atmungsaktivierende Stoffe umfassen. Im vorigen Abschnitt stellten wir bereits fest, dass aus dem Pilzmyzel solche Stoffe extrahiert werden können (Extrakt I). Die Menge Pilzmaterial, die bei der Herstellung des Extrakts III verarbeitet wird, ist jedoch relativ so klein, dass der Effekt der atmungsaktivierenden Stoffe aus dieser Quelle nur gering sein kann, es sei denn, dass die Bildung dieser Stoffe in parasitischen Verhältnissen zugenommen hätte.

Aber auch das lebende, gesunde Kartoffelgewebe enthält Stoffe, welche die Atmung beeinflussen. Mehrere Forscher (u.a. ONSLOW, 1919) isolierten aus Kartoffelknollen eine Ortho-diphenol-Verbindung, die nach BOSWELL u. WHITING (1938) die Atmung von Kartoffelscheibchen in Phosphatpuffer um etwa 20 % steigern kann. Diesem Faktor wurde in unseren Versuchen Rechnung getragen und zwar dadurch, dass ein Extrakt aus gesunden Kartoffelzylindern oder -scheiben dem Extrakt III als Kontrolle gegenüber gestellt wurde. Eine mögliche Atmungserhöhung durch Extrakt III darf daher, in sofern sie die Kontrolle übersteigt, grösstenteils den, aus dem vom Parasiten beeinflussten Teil der Wirtspflanze stammenden, atmungsaktivierenden Stoffen zugeschrieben werden.

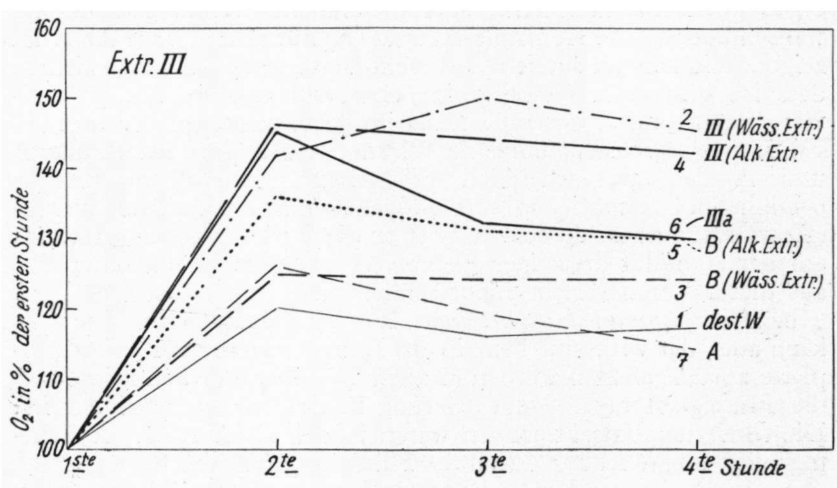
Die wichtigsten Ergebnisse der Atmungsversuche mit Extrakt III werden untenstehend angeführt. Bei der Beurteilung der Resultate muss man berücksichtigen, dass die fraglichen Stoffe im Extrakt schon in einer niedrigeren Konzentration anwesend sind, als im lebenden Substrat. Wenn z.B. ein Gewebezylinder von etwa 1 cm^3 Inhalt in 5 cm^3 Wasser extrahiert wird, so stellt die Konzentration der löslichen Stoffe im Extrakt sich auf höchstens ein Sechstel derjenigen im Gewebe.

a. *Wirkung wässeriger und alkoholischer Extrakte.* Wässerige und äthylalkoholische Extrakte von infizierten Kartoffelzylindern ergaben im Atmungsversuch, im Vergleich mit destilliertem Wasser, eine nahezu gleiche Atmungssteigerung (*Tabelle 40* und *Fig. 9*). Diese Wirkung übersteigt deutlich die Effekte der Kontrolle-Extrakte (B), die aus nicht-infizierten Zylindern stammten. Die Wirkung des

TABELLE 40. (s. Fig. 9).

Versuch: 16-3-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm³ dest. Wasser oder Extrakt.
Einsatz: 0.4 cm³ KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Kartoffelzylinder (35 × 5 mm, „Bintje"), teilweise infiziert mit *Gibberella Saubinetii* (Kultur: 6—14/3/39). Alle Zylinder in 5 cm³ dest. Wasser oder 96 %igem Alkohol eine Nacht bei Zimmertemperatur extrahiert. Flüssigkeiten filtriert; wässerige Extrakte autoklaviert (½ Stunde bei 112° C.), alkoholische Extrakte eingedämpft und Rückstände gelöst in dest. Wasser (5 cm³ pro Zylinder).
Extrahierte Zylinder im Mörser mir Quarzsand zerrieben und in 80 %-igem Alkohol nochmals ausgezogen. Flüssigkeiten eingedämpft und in dest. Wasser gelöst, wie oben. (Extrakt IIIa und Kontrolle-Extrakt A)

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm³/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	46.0	120	116	117
2	wäss. Extrakt III	44.1	142	150	145
3	wäss. Kontr. Extrakt B.	44.3	125	124	124
4	alk. Extrakt III	42.8	146	144	142
5	alk. Kontr. Extrakt B.	40.8	136	131	130
6	Extrakt IIIa.	43.9	145	132	130
7	Kontr. Extrakt A.	46.4	126	119	114



Figur 9, s. Tabelle 40.

wässerigen Extrakts III übertrifft die des wässerigen Kontrolle-Extrakts jedoch in bedeutend höherem Masse, als der alkoholische Extrakt III seiner Kontrolle überlegen ist. Es betrifft hier keinen zufälligen Unterschied, denn auch bei Wiederholung der Versuchsreihe trat er auf. Wir könnten auf den ersten Blick die höhere Wirkung des alkoholischen Kontrolle-Extrakts etwa auf eine schnellere und vollständigere Extraktion infolge des Abtötens des Gewebes durch den Alkohol zurückführen. Aber es fragt sich dann, warum der alkoholische Extrakt III nicht gleichfalls eine stärkere Wirkung als der wässerige Extrakt III zeigt. Hierauf könnte man erwidern, dass möglicherweise die vom Pilz abgebaute Aussenschicht des Zylinders die Extraktion des infizierten Gewebes dermassen erleichtert, dass der Alkohol nicht länger bevorzugter Extraktionsmittel ist.

Diese Vorstellung führt uns dann weiter zu dem Gedanken, dass der ganze Unterschied im Effekt zwischen Extrakt III und Kontrolle-Extrakt B bloss auf einer vollständigeren Extraktion des infizierten gegenüber dem gesunden Kartoffelgewebe beruhen könnte. Diese Möglichkeit wird jedoch durch die Tatsache, dass das gesunde Gewebe auch nach wiederholter und gründlicher Extraktion keine höhere Aktivität aufweist, widerlegt. Dies geht aus Tabelle 40 hervor. in der die Gefässe 6 und 7 die Wirkung der bei der ersten Extraktion zurückgebliebenen aktiven Stoffe demonstrieren. Zu diesem Zweck wurden die mittels Wasser oder Alkohol ausgezogenen Zylinder nach Zerreiben mit Quarzsand nochmals extrahiert und zwar mit 80 %-igem Alkohol. Dieser zweite Extrakt des infizierten Gewebes (IIIa) ergab noch eine merkliche, aber abnehmende Atmungserhöhung, während der zweite Kontrolle-Extrakt (A) nur sehr geringe Aktivität zeigte. Wir können somit aus diesem Versuch den Schluss ziehen, dass im befallenen Gewebe eine erheblich grössere Menge aktivierender Stoffe anwesend ist, als im gesunden Gewebe.

Die atmungsbeschleunigende Wirkung der Kontrolle-Extrakte B und A darf wahrscheinlich grösstenteils dem obengenannten o-Diphenol zugeschrieben werden. Daneben ist ein geringer Zuckereffekt nicht ausgeschlossen. In wiefern die Wirkung des Extrakts III auf der Aktivität derartiger Phenolverbindungen beruht, lässt sich aus dieser Versuchsreihe nicht schliessen.

b. *Adsorption an das Seitzfilter.* Wie bei den Extrakten I und II kann auch das wirksame Prinzip aus Extrakt III von der Seitzfilterplatte zurückgehalten werden (*Tabelle 41*). Der Versuch zeigt, dass die Flüssigkeit nach Seitzfiltrierung nahezu völlig inaktiviert ist. Die filtrierten Extraktmengen waren jedoch klein. Auch die Kontrolle hat ihre Wirkung durch die Filtrierung verloren.

c. *Adsorption an Kohle.* Es gelang Extrakt III durch Behandlung

TABELLE 41.

Versuch: 19-10-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 Extrakt.
Einsatz: 0.6 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Kartoffelzylinder (40 × 5 mm, „Eigenheimer") teilweise infiziert mit *Gibberella Saubinetii* (Kultur: 6—15/10/38). Alle Zylinder je in 5 cm^3 dest. Wasser 2 Tage bei Zimmertemperatur extrahiert. Flüssigkeiten filtriert und autoklaviert (½ Stunde bei 112° C.) oder Seitzfiltriert.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	Extrakt III autoklaviert	32.3	167	150	158
2	Kontr. B „	29.6	135	130	140
3	Extrakt III Seitzfiltriert	33.2	116	128	136
4	Kontr. B „	30.6	117	129	127

TABELLE 42.

Versuch: 15-11-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 Extrakt (nach der ersten Stunde).
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Kartoffelzylinder (35 × 5 mm, „Eigenheimer") teilweise infiziert mit *Gibberella Saubinetii* (Kultur: 31/10—11/11/38). Alle Zylinder je in 5 cm^3 dest. Wasser eine Nacht bei Zimmertemperatur extrahiert. Flüssigkeiten filtriert, kurz aufgekocht. pH des Extrakts III (über 7.6!) mittels HCl herabgesetzt bis auf pH 6.8 (= pH Kontrolle-Extrakt). 10 cm^3 beider Extrakte zweimalig mit 0.2 g Noritkohle behandelt; filtriert.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff		
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde	
		1. St.	2.	3. St.
1	Kontrolle-Extrakt B	61.8	121	125
2	Extrakt III	59.2	178	167
3	Kontrolle-Extrakt B, Kohle-Filtrat	60.0	115	119
4	Extrakt III, Kohle-Filtrat	61.5	105	113

mit Kohle vollständig zu inaktivieren (*Tabelle 42*). Auch die Wirkung der Kontrolle wurde durch Kohle abgeschwächt, aber ein Teil der Aktivität blieb im Filtrat zurück. Spätere Versuche ergaben, dass Extrakt III weniger reduzierende Zucker enthielt als die Kontrolle: während ersterer nur schwach reagierte, ergab letztere eine deutliche LUFF-Reaktion. Möglicherweise beruht daher die Wirkung des Kontrolle-Extrakts teilweise auf der Anwesenheit dieser Zucker.

In einigen orientierenden Versuchen wurde die Kohle erfolglos mit Aceton-Ammoniak und Pyridin-Methylalkohol eluiert. Die Eluate des Extrakts zeigten zwar einige Wirkung, aber diese stieg ungenügend über die des Kontrolle-Eluats hinaus, um ihr besonderen Wert beizumessen. Weitere Versuche in dieser Richtung mussten leider wegen der Mobilmachung Ende August 1939 abgebrochen werden.

d. *Wirkung auf die Atmung frischgeschnittener Scheibchen.* In den vorhergehenden Versuchen verwendeten wir, wie üblich, gewässerte Kartoffelschnitten als Atmungsobjekte. *Tabelle 43* zeigt, dass auch

TABELLE 43.

Versuch: 21-11-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Frisch-geschnittenes Gewebe.
Extrakte: s. Tabelle 42.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	38.4	102	108	113
2	Kontrolle-Extrakt B	32.3	105	106	111
3	Extrakt III	27.8	115	120	124

frischgeschnittene Scheibchen auf Zusatz des Extrakts III mit einer Atmungserhöhung reagieren. Der Effekt ist jedoch viel kleiner als nach Vorbehandlung der Schnitten; die Wirkung des Kontrolle-Extrakts ist kaum noch zu spüren. Der Extrakt war derselbe, der im vorigen Versuch (Tabelle 42) den gewässerten Schnitten zugesetzt wurde und dort eine starke Atmungssteigerung hervorrief. Dieses Beispiel legt den Einfluss der Vorbehandlung auf das Reaktionsvermögen des Atmungsmechanismus nochmals klar dar.

TABELLE 44.

Versuch: 5-12-38.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: Knolle 4 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Gewebescheibchen frisch-geschnitten.
Extrakte: Kartoffelzylinder („Eigenheimer", 35 × 5 mm) teilweise mit *Gibberella Saubinetii* infiziert (Kultur: 15/11—24/11/38). Alle Zylinder je in 5 cm^3 dest. Wasser eine Nacht bei Zimmertemperatur extrahiert. Flüssigkeiten filtriert und autoklaviert (½ Stunde bei 112° C.). Extrakte im Kühlschrank aufbewahrt. Ein Teil beider (III und B) Extrakte einmalig mit Diäthyläther ausgeschüttelt. Ätherlösliche und -unlösliche Fraktionen eingedämpft und gelöst in dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/ Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	49.3	92	99	104
2	Kontr. Extr. B, ätherlösl.	49.4	91	102	105
3	Extr. III, ätherlöslich	53.0	88	100	106
4	Kontr. Extr. B, ätherunlösl.	49.9	97	111	115
5	Extr. III, ätherunlöslich	50.3	99	115	122

e. *Löslichkeit in Äther.* Aus *Tabelle 44* geht hervor, dass auch die wirksamen Substanzen im Extrakt III zu den ätherunlöslichen Stoffen gehören. Es handelt sich auch in diesem Versuch um frischgeschnittene Scheibchen als Atmungsmaterial. Die Knolle, der sie entnommen wurden, war jedoch vorher 4 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die ziemlich hohe Anfangsatmung darf vielleicht auf diese Vorbehandlung zurückgeführt werden; das Reaktionsvermögen der Atmung blieb jedoch auch bei diesem frischgeschnittenen Material klein.

Der Unterschied zwischen den Wirkungen der beiden Fraktionen ist allerdings gross genug um festzustellen, dass die atmungsaktivierenden Stoffe des Extrakts sich in der ätherunlöslichen Fraktion befanden. Dies trifft auch für den Kontrolle-Extrakt zu. Im Einklang mit diesem Befund steht die Erwähnung BOSWELL u. WHITINGS (1938), dass der atmungserhöhende Faktor (Phenol-Verbindung), aus gesunden Kartoffelknollen isoliert, sich als ätherunlöslich erwies.

f. *Löslichkeit in Chloroform.* Auch nach dem Ausschütteln des Extrakts III mit Chloroform blieb das wirksame Prinzip grösstenteils in der wässerigen Lösung zurück (*Tabelle 45*). Der Versuch zeigt, dass die chloroformlöslichen Fraktionen der Extrakte (III und B)

TABELLE 45.

Versuch: 21-10-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt (nach d. 1. Stunde).
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: s. Tabelle 41. Beide Extrakte (III und B) mit Chloroform ausgeschüttelt. Chloroformlösliche und -unlösliche Fraktionen eingedämpft; Rückstände gelöst in dest. Wasser (etwa ein Drittel des Ausgangsvolumens).

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	51.2	121	119	127
2	Kontr. Extr. B, chloroformlöslich	49.9	146	129	146
3	Extrakt III, chloroformlöslich	50.8	147	133	145
4	Kontr. Extr. B, chloroformunlöslich	49.0	150	138	152
5	Extrakt III, chloroformunlöslich	50.9	171	143	156

noch einige atmungsaktivierende Wirkung aufweisen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass sie in etwa dreifacher Konzentration in Anwendung kamen. Es kann somit höchstens nur von einer schwachen Löslichkeit der aktiven Stoffe in Chloroform die Rede sein.

g. *Thermostabilität.* Aus den vorhergehenden Versuchen konnte man bereits ersehen, dass der Extrakt auch nach einer Autoklavbehandlung von einer halben Stunde bei 112° C. noch eine starke Aktivität zeigt.

Der Verlust eines Teils der atmungsaktivierenden Wirkung durch Eindämpfen der Flüssigkeit auf dem Wasserbad, auf den wir bei den Extrakten I und II hinwiesen, tritt auch beim Extrakt III auf (*Tabelle 46*). Beim Wiederlösen des trocknen Rückstands blieb, ähnlich wie beim Myzelextrakt, ein Teil als unlösliche Häutchen zurück. Wahrscheinlich enthielt dieser unlösliche Rest einen Teil der aktiven Stoffe in einer denaturierten Form.

Der pH-Wert des Extrakts betrug in diesem Falle 7.9, während sich für den gleichzeitig hergestellten Kontrolle-Extrakt ein pH-Wert von 6.7 ergab. Der Parasit ruft also bei seinem Wachstum auf dem lebenden Substrat, genau wie in Reinkultur, eine Verschiebung des pH nach der alkalischen Seite hervor. Beim Eindämpfen stieg das pH bis über 8.8. Hier liegt vielleicht eine Spaltung von Bicarbo-

TABELLE 46.

Versuch: 16-11-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt III (nach der ersten Stunde).
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakt: s. Tabelle 42. 10 cm^3 des Extrakts zur Trockne gedampft und wieder gelöst in 10 cm^3 dest. Wasser.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff mm³/Stunde	verbrauchter Sauerstoff in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	51.3	106	111	121
2	Extrakt III	51.8	178	167	175
3	Extrakt III, eingedämpft	48.1	149	140	152

TABELLE 47.

Versuch: 9-11-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt (nach der ersten Stunde).
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Kartoffelzylinder („Eigenheimer", 35 × 5 mm) teilweise mit *Gibberella Saubinetii* infiziert (Kultur: 25/10-3/11/38). Alle Zylinder je in 5 cm^3 dest. Wasser eine Nacht bei Zimmertemperatur extrahiert. Flüssigkeiten filtriert und autoklaviert (½ Stunde bei 112° C.); im Kühlschrank aufbewahrt. Extrakte mit destilliertem Wasser verdünnt.

Gefäss Nr.	Zusatz	Verdünnungen	verbrauchter Sauerstoff mm³/Stunde	verbrauchter Sauerstoff in Proz. d. ersten Stunde		
			1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser		64.5	101	111	113
2	Kontr. Extr. B	unverdünnt	63.8	112	124	126
3	„ „	1 : 10	65.4	110	113	116
4	„ „	1 : 100	65.7	108	114	115
5	Extrakt III	unverdünnt	62.7	136	130	135
6	„ „	1 : 10	61.6	114	118	119
7	„ „	1 : 100	64.4	107	115	116

naten vor, deren Anwesenheit im Extrakt durchaus annehmbar ist.

h. *Wirkung nach Verdünnung.* Nach Verdünnung des Extrakts III und der Kontrolle nimmt der Unterschied in Aktivität der beiden Extrakte ziemlich schnell ab (*Tabelle 47*). Im vorliegenden Versuch übte der Extrakt III in zehnfacher Verdünnung noch eine deutliche Wirkung auf die Atmung aus; in der Verdünnung 1 : 100 zeigten beide Extrakte (III und B) noch einen geringen, aber gleichen Effekt im Vergleich zum destillierten Wasser. Wie gesagt, ist die Ausgangskonzentration der wirksamen Stoffe im Extrakt III klein, kleiner als im lebenden Substrat. Die zehnfache Verdünnung entspricht etwa $^1/_{60}$ der ursprünglichen Konzentration der aktiven Stoffe im Substrat. Diese Angaben weisen darauf hin, dass diese atmungsaktivierenden Stoffe sich im befallenen lebenden Gewebe in genügend hoher Konzentration vorfinden können, um dort eine erhebliche Atmungssteigerung hervorzurufen.

Diese Daten über die Eigenschaften des wirksamen Prinzips im Extrakt III bedürfen noch vieler Ergänzungen und Erweiterungen, bevor wir uns ein klares und einheitliches Bild der Natur und der Wirkungsweise der fraglichen Stoffe machen können. Wenn es auch unsere Aufgabe nicht sein konnte, das vorliegende Problem kurzfristig zu erledigen, so hatten wir doch noch einige weitere Versuche geplant. Diese konnten, wie bereits oben erwähnt, nicht zur Ausführung gelangen.

i. *Zusammenfassung.* 1. Der Extrakt des durch *Gibberella Saubinetii* befallenen Kartoffelgewebes (Extrakt III) übt auf Gewebeschnitten eine atmungserhöhende Wirkung aus. Dieser Effekt übersteigt merklich die Atmungssteigerung, die vom Extrakt gesunden Gewebes (Extrakt B) herbeigeführt wird. Der Wirkungsunterschied dieser Extrakte beruht nicht auf einer vollständigeren Extraktion des befallenen Gewebes.

2. Die atmungsaktiven Stoffe im Extrakt III sind an Kohle und an die Seitzfilterplatte adsorbierbar. Auch der Kontrolle-Extrakt verliert durch Kohlebehandlung oder Seitz-Filtrierung an Aktivität.

3. Der atmungsaktivierende Effekt des Extrakts tritt nicht nur bei Anwendung von gewässerten, sondern auch von frischgeschnittenen Scheibchen auf. Die Atmungserhöhung ist im letzteren Falle jedoch bedeutend schwächer.

4. Das wirksame Prinzip des Extrakts III ist in Diäthyläther und in Chloroform nicht, oder nur in geringem Masse löslich.

5. Es ist in wässeriger Lösung thermostabil, verliert aber zur Trockne gedampft einen Teil seiner Wirkung, während der Trockenrückstand teilweise unlöslich geworden ist.

6. Der Extrakt ist auch in Verdünnung noch wirksam, obwohl die Konzentration der wirksamen Stoffe im Extrakt bereits geringer ist als im befallenen Gewebe, das als Ausgangsmaterial dient.

ABSCHNITT VII.

DER EINFLUSS VON ZUCKERN AUF DIE ATMUNG DES KARTOFFELGEWEBES („ZUCKEREFFEKT").

Wie schon öfters erwähnt, führen Zucker eine Atmungserhöhung des Kartoffelgewebes herbei. Die Wirkung, welche die RICHARDS-Nährlösung auf die Atmung ausübt, haben wir dem 5 %igen Glukosegehalt dieser Flüssigkeit zugeschrieben.

CALDWELL u. MEIKLEJOHN (1937) stellten in ihren Versuchen mit Tomatenstengelgewebe fest, dass Zusatz von Glukose und Fruktose nur die Atmung von sehr jungem Gewebe deutlich steigert. Der Atmungsquotient behauptet sich dabei auf etwa 1.0. Sie schlossen hieraus, dass die Atmung in den sehr jungen Gewebeteilen durch die verfügbare Menge Atmungssubstrat (Kohlehydrat), in älteren Geweben durch die Kapazität des respiratorischen Enzymsystems begrenzt wird.

TURNER (1938) arbeitete mit Möhrengewebe und erzielte gleichfalls eine erhöhte Atmung bei Anwesenheit von Glukose. Bei Aeration mit Luft entstand jedoch aerobe Gärung (hoher R.Q.) und erst bei höherem partiellen Sauerstoffdruck erhielt er wieder einen normalen Atmungsquotient und eine Atmung auf höherem Niveau.

BOSWELL u. WHITING (1938) sind der Ansicht, dass Glukose und Saccharose auf die Atmung von Kartoffelknollenschnitten keinen Einfluss ausüben, wenn nur Bakterien fehlen. Eine geringe Bakterieninfektion soll leicht nachweisbar sein, dadurch, dass nach Zusatz von ½ cm^3 5 %iger Zuckerlösung die Atmung schnell steigt. Ihre Versuchstemperatur von 31° C. ist jedoch sehr günstig für die schnelle Entwicklung einer „Bakterienatmung". Aus dem von diesen Forschern angeführten Beispiel geht die erwähnte schnellere Steigung der Atmung unter Einfluss der Zucker nicht eindeutig hervor. Die Steigung nach Glukose-Zusatz hat prozentweise sogar denselben Wert als ohne Zusatz; nur lag das Atmungsniveau im ersteren Falle höher. Übrigens ist es nicht ganz klar, wie man sich die Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs durch Bakterieninfektion denken muss: unmittelbar durch Bakterienatmung, oder aber indirekt durch Bil-

dung von Stoffen durch die Bakterien, die atmungsaktivierend auf das Kartoffelgewebe einwirken.

Auf Grund eigener Erfahrung können wir der Meinung dieser Forscher, dass Zucker bei Abwesenheit von Bakterien keinen Einfluss auf die Atmung des Kartoffelgewebes haben, nicht beistimmen. In mehreren Versuchen stellten wir den „Zuckereffekt" fest und immer trat die Wirkung sofort, d.h. innerhalb einer halben Stunde nach dem Zusatz der Zuckerlösung, hervor und blieb in den nächsten Stunden ziemlich konstant.

Ein steigender Sauerstoffverbrauch infolge Bakterienentwicklung verläuft nach unsrer Meinung und Erfahrung anders: die Kurve zeigt anfänglich eine langsame Steigung, die jedoch immer mehr zunimmt und schliesslich steil emporsteigt. Im Abschnitt II wurde ausserdem darauf hingewiesen, dass bei Beachtung der erwähnten Vorsichtsmassnahmen eine etwaige Bakterienatmung keine bedeutende Rolle spielen kann.

Geiger-Huber (1935) fand die Atmungsgeschwindigkeit von Hefen durch Glukosezusatz der Zuckerkonzentration proportional erhöht, aber nur in niedrigen Konzentrationen. Er kommt zu der Anschauung, dass nur jene kleine Zuckermenge für die Atmungsgeschwindigkeit von direkter Bedeutung ist, die „in der Zelle in irgendeiner bestimmten Weise festgelegt und dadurch offenbar in eine reaktionsfähige Form übergeführt wird".

Der Einfluss von Zuckern auf die Atmung von Hefen und kohlehydratarmen Pflanzenorganen, die für ihren respiratorischen Stoffwechsel in hohem Masse von der Zufuhr des Atmungssubstrats von aussen her abhängig sind, liegt auf der Hand. Dies trifft nicht zu für den Zuckereinfluss auf die Atmungsintensität der kohlehydratreichen Speicherorgane, wie die Kartoffelknolle und die Mohrrübe. Dieser steht offenbar im Zusammenhang mit einer limitierten Verfügbarkeit des Atmungssubstrats, bezw. mit einer beschränkten Umwandlung von Stärke in Zucker.

Hopkins (1924) und Barker (1933) wiesen dann auch nach, dass Kartoffelknollen bei zunehmender innerer Zuckerkonzentration eine steigende Atmungsgrösse zeigten. Dieser erhöhte Zuckergehalt wurde unter Einfluss niedriger Temperaturen herbeigeführt. Zunahme des Zuckergehalts über eine bestimmte Konzentration rief jedoch keine weitere Steigung der Atmung hervor. Nach Barker tritt ausserdem ein hemmender Faktor auf, der sich infolge der Vorbehandlung bei niedriger Temperatur „akkumuliert" und sich bei höherer Temperatur „entwickelt". Solange diese Entwicklung des Hemmungsfaktors nicht stattgefunden hat, zeigt die Kurve, die das Verhältnis zwischen Atmungsgrösse und innerer Zuckerkonzen-

tration darstellt, viel Übereinstimmung mit der enzymatischen Hyperbel. Bei völliger Entwicklung der Hemmung ist die benötigte Zuckerkonzentration, um eine bestimmte Atmungsintensität zu erzielen, sehr viel grösser als ohne Hemmung. Ausserdem erwies sich, dass bei zunehmender Zuckerkonzentration die Hemmung prozentweise abnimmt. BARKER schreibt diese Erscheinungen der Möglichkeit zu, dass Hemmungsfaktor sowohl wie Zucker mit dem Atmungsferment in Verbindung treten und dass dem ersteren dabei Konkurrenz gemacht wird vom Zucker (competitive inhibition).

In einem späteren Bericht (BARKER, 1936) kommt dieser Forscher zu dem Schluss, dass nicht Glukose oder Fruktose, sondern Saccharose eng mit der Substratzufuhr der Kartoffelatmung verknüpft ist.

Tabelle 48 gibt eine Übersicht der eigenen Versuche, aus denen der Einfluss der Zucker auf die Atmungsintensität des Kartoffelgewebes hervorgeht. Es zeigt sich, dass Zuckerzusatz, wenn nur nicht in zu niedriger Konzentration, immer eine Atmungserhöhung herbeiführt. Der Zuckereffekt schwankt allerdings ziemlich stark in den verschiedenen Versuchen. Gleichfalls wie die Effekte der Extrakte I, II und III wird auch der Zuckereffekt vom physiologischen Zustand des Kartoffelgewebes abhängig sein, immerhin von Faktoren, die mit physiologischen Umwandlungen in der Knolle während des „Ruhestadiums" im Zusammenhang stehen.

Man könnte entgegnen, dass die Atmungsreaktion nach Zuckerzusatz etwa auf eine Erniedrigung des Zuckergehalts der Zellen infolge Exosmose während des langen Spülens der Gewebeschnitten zurückzuführen wäre. Wir haben jedoch schon öfter darauf hingewiesen, dass gewässerte Scheibchen eine erheblich grössere Atmungsintensität als frischgeschnittene aufweisen. Man kann sich somit vielmehr die Entfernung eines Hemmungsfaktors durch Exosmose bei der Vorbehandlung der Schnitten denken. Wie aus dem Versuch vom 17-4-39 (s. Tab. 48) ersichtlich ist, zeigten Schnitten, die 2 Tage gewässert worden waren, eine hohe Anfangsatmung, aber der Effekt 2 %iger Glukose war kleiner als gewöhnlich. Ausserdem reagiert auch das frischgeschnittene Gewebe auf Zuckerzugabe, wie wir aus der Wirkung RICHARDSscher Lösung auf Gewebezylinder (Tabelle 39) ersahen.

Schliesslich konnte man einwenden, dass der „Zuckereffekt" etwaigen Verunreinigungen der gebrauchten Zucker zuzuschreiben wäre. Gewöhnlich kam die übliche Glukose ***purissimum*** in Anwendung. In einigen Versuchen (14-4, 17-4 und 19-8-39) wurde jedoch Glukose vom Fabrikat *Pfanstiehl* verwendet, die nur 0.05 % Asche enthält und, wie die Tabelle 48 zeigt, gleichfalls den Zuckereffekt hervorruft. Die Annahme, dass nur die Zucker selbst am „Zucker-

TABELLE 48.

Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm oder 60 Schn. v. ½ mm, in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 oder 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Zucker-Lösung.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.

Versuch	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff					
		mm^3/ Stunde	in Prozenten der ersten Stunde				
		1. St.	2.	3.	4.	5.	6. St.
5-10-38	0.6 cm^3 dest. Wasser	53.3	102	115	120		
	0.6 „ 4%ige Saccharose-Lös.	52.0	112	125	133		
6-1-39	0.3 cm^3 dest. Wasser	60.8	101	111	124		
	0.3 „ 25%ige Glukose-Lös.	60.3	117	126	144		
	0.3 „ 2.5%ige „ „	57.1	105	117	130		
	0.3 „ 0.25%ige „ „	60.9	100	111	124		
	0.3 „ 25%ige Saccharose-Lös.	63.2	104	110	123		
	0.3 „ 25%ige Fruktose-Lös.	61.5	107	113	128		
	0.3 „ 25%ige Maltose-Lös.	58.3	103	116	128		
14-4-39	0.3 cm^3 dest. Wasser	55.4	110	114	120		
	0.3 „ „ „	60.2	108	114	120		
	0.3 „ 1%ige Glukose-Lös.	54.4	123	131	140		
	0.3 „ „ „ „	55.8	120	130	136		
17-4-39	0.3 cm^3 dest. Wasser	59.1	94	100	99		
	0.3 „ „ „	60.5	93	98	100		
	0.3 „ 2%ige Glukose-Lös.	67.2	99	109	110		
	0.3 „ 0.2%ige „ „	64.0	97	101	100		
	0.3 „ „ „ „	62.6	99	106	107		
	0.3 „ 0.1%ige „ „	63.5	95	101	100		
	0.3 „ „ „ „	63.1	92	103	102		
3-6-39	0.3 cm^3 dest. Wasser	107.3	110	113	118	123	
	0.3 „ 5%ige Glukose-Lös.	106.0	120	128	135	140	
19-8-39	0.3 cm^3 dest. Wasser	68.7	100	104	107	111	113
	0.3 „ 20%ige Glukose-Lös.	71.4	119	129	135	138	142
	0.3 „ 10%ige „ „	70.8	117	127	132	136	140
	0.3 „ 5%ige „ „	73.7	111	117	121	127	129
24-8-39	0.3 cm^3 dest. Wasser	81.9	101	105	104		
	0.3 „ 40%ige Glukose-Lös.	85.8	129	145	145		
	0.3 „ 20%ige „ „	81.4	122	134	134		

effekt" beteiligt seien, gewinnt hierdurch erheblich an Wahrscheinlichkeit.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, erzielte Glukose im Versuch von 6-1-39 eine höhere Wirkung als Fruktose, Maltose und Saccharose. Dieser Befund weist darauf hin, dass diesen Zuckern nicht allen dieselbe Bedeutung für die Atmung beigelegt werden kann. Der äusserst niedrige Effekt der Saccharose in diesem Versuch ist allerdings nicht im Einklang mit der oben angeführten Anschauung BARKERS, dass gerade dieser Zucker als Atmungssubstrat für das Kartoffelgewebe am meisten in Betracht käme.

Die beiden letzten in Tabelle 48 erwähnten Versuche ergeben, dass die Atmung der Kartoffelschnitten auch in den höheren Zuckerkonzentrationen bei steigender Zuckerzugabe noch immer mehr erhöht wird. Der Zusatz von 0.3 cm^3 40 %iger Glukose entspricht einer Endkonzentration im Atmungsgefäss von etwa 5 %. Der Einfluss noch höherer Zuckerkonzentrationen ist nicht untersucht worden, mit Ausnahme eines Zusatzes von 0.6 cm^3 60 %iger Glukoselösung, der neben dem Turgorverlust und wahrscheinlich im Zusammenhang mit diesem, eine starke Verminderung der Atmungsintensität herbeiführte. Die mehr oder weniger proportionale Abhängigkeit der Atmungsgeschwindigkeit von der Zuckerkonzentration, wie unsere Angaben erkennen lassen, deutet darauf hin, dass der Zucker hier als „begrenzender Faktor", nach der Lehre BLACKMANS (1905), auftritt. Obgleich der Atmungsquotient CO_2/O_2 in diesen Versuchen nicht bestimmt wurde, geht aus ihnen klar hervor, dass der partielle Sauerstoffdruck nicht ins Minimum kam. Die Aktivität der Extrakte I, II und III zeigt jedoch, dass ausser Zuckern auch andere thermostabile Stoffe die Atmung des Kartoffelgewebes erheblich beschleunigen können.

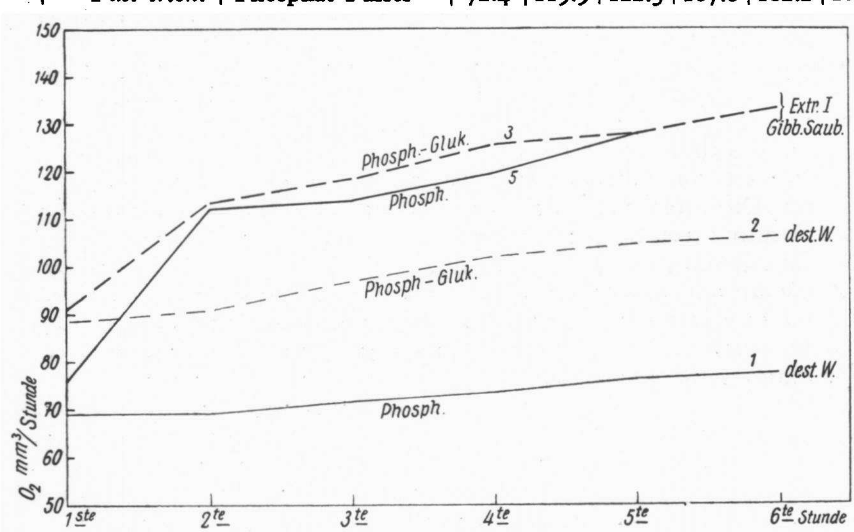
Bis jetzt studierten wir die Wirkung der Zucker und der atmungsaktivierenden Stoffe der Extrakte möglichst getrennt. Es fragt sich nun aber, wie sich beide Einflüsse in Kombination verhalten. Bei der Besprechung der Ergebnisse des Extrakts II wurde bereits die Möglichkeit berücksichtigt, dass der Zuckereffekt neben dem vom Pilz gebildeten aktiven Prinzip am Totaleffekt beteiligt war. *Tabelle 49* und *Fig. 10* veranschaulichen jetzt die Wirkung zweier Extrakte mit oder ohne 6 % Glukose in der Suspensionsflüssigkeit.

Der Extrakt I von *Gibberella Saubinetii* steigert die Atmung bis auf ein bestimmtes Niveau, dessen Höhe offensichtlich unabhängig ist vom Zuckereffekt. Beide Wirkungen sind somit nicht kumulativ und dieser Befund deutet darauf hin, dass beide sich auf dasselbe Atmungssystem, also wahrscheinlich auf das Polyphenoloxydasesystem, beziehen. Nach diesem Gedankengang treten unter den

TABELLE 49. (s. Fig. 10).

Versuch: 19-8-39 (Gefäss 5: 11-8-39, Gefäss 6: 18-8-39).
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Muizen", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Die Pufferlösung in den Gefässen 2, 3 und 4 enthält 6 % Glukose.
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Extrakt.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Extrakte: Extr. I — 1 g Trockenmyzel von *Gibberella Saubinetii* (Kultur: 17/3-22/5/39) in 20 cm^3 dest. Wasser 15 Minuten aufgekocht, filtriert.
Extr. II — Kulturflüssigkeit von *Fusarium trichothecioides* (Kultur: 8/7—12/8/39), auf verdünnter Rich. Lösung gezogen, zweimalig Seitzfiltriert.

Gefäss Nr.	Zusatz	Hauptraum	verbrauchter Sauerstoff in mm^3/Stunde 1.	2.	3.	4.	5.	6. St.
1	dest. Wasser	Phosph. Puffer	68.7	68.8	71.4	73.6	76.3	77.7
2	dest. Wasser	Phosphat Puffer + 6% Glukose	88.3	90.7	97.0	102.0	104.4	106.2
3	Extr. I *Gibb. Saub.*	Phosphat Puffer + 6% Glukose	91.4	113.1	118.2	125.5	127.9	133.1
4	Extr. II *Fus. trich.*	Phosphat Puffer + 6% Glukose	89.2	107.5	111.0	103.2	99.2	95.7
5	Extr. I *Gibb. Saub.*	Phosphat Puffer	74.3	112.2	113.9	119.4	127.9	
6	Extr. II *Fus. trich.*	Phosphat Puffer	72.4	119.9	122.5	107.0	102.2	100.3



Figur 10, s. Tabelle 49.

gegebenen Versuchsbedingungen in diesem System zwei verschiedene Substanzen, und zwar Zucker einerseits und der Extraktfaktor andrerseits, als „begrenzende Faktoren" auf.

Der Zuckereffekt ist, nach allgemeinen Ansichten, verknüpft mit der Atmungssubstratlieferung. Die Wirkung des Extraktfaktors beruht, wie wir noch zeigen werden, jedoch höchstwahrscheinlich nicht auf dem Zusatz eines Atmungssubstrats. Wenn dies zutrifft, dann muss jedenfalls die zur Verfügung der Zelle stehende Atmungssubstratmenge, dem Mehrverbrauch entsprechend, unter Einfluss des wirksamen Prinzips gesteigert werden. Der Zuckereffekt lehrt uns, dass die Zelle nicht mit Zucker gesättigt ist. Das zur Verfügung gestellte Substrat muss dann auch aus der Zelle selbst und zwar voraussichtlich aus den aufgespeicherten Kohlehydraten stammen. Nach diesen Ansichten beziehen Zucker- und Extraktwirkung sich beide auf die Substratzufuhr im Atmungssystem und somit auf denselben „begrenzenden Faktor". Die Ergebnisse in Tabelle 49 zeigen, dass die Wirkung des Extraktfaktors den Vorzug vor dem Zuckereffekt zu haben scheint und letzteren völlig verdrängt (wenn nicht die Atmung einen Maximalwert erreicht hat, bei dem ein anderer Faktor als die Substratlieferung ins Minimum kommt und begrenzend wirkt). Für die gleichzeitige Wirkung der beiden Faktoren gilt also nicht das Gesetz der Massenwirkung.

Vielleicht gestatten unsere Angaben noch andere Anschauungen über das gegenseitige Verhältnis des Zuckers und des Extraktfaktors zu dem Atmungsmechanismus. Unsere Daten bedürfen jedoch noch mancher Ergänzungen, ehe die vorliegenden Fragen endgültig gelöst werden können und weitgehende theoretische Folgerungen gezogen werden dürfen. Uns fehlte dazu leider die Gelegenheit.

Die Wirkung des Extrakts II von *Fusarium trichothecioides* in Gegenwart von Glukose geht gleichfalls aus dieser Versuchsreihe hervor. Die anfängliche Steigerung, sowohl als die spätere Hemmung der Atmung treten auch hier unabhängig vom Zuckereffekt auf; die Atmungsgeschwindigkeit erfährt diese Einflüsse, als ob kein Zucker anwesend war und sie sinkt schliesslich auf einen Wert, der bedeutend niedriger war, als die Atmung im Kontrollegefäss, dem nur Zucker zugesetzt wurde. Die Zuckerwirkung wird somit auch vom Hemmungseffekt verdeckt.

ABSCHNITT VIII

DAS VORKOMMEN ATMUNGSAKTIVIERENDER STOFFE IN ANDEREN ROHPRODUKTEN, IM ZUSAMMENHANG MIT DER ANWESENHEIT EINIGER WIRKSTOFFE.

1. Der Einfluss von Rohpepton und Hefeextrakten auf die Atmung des Kartoffelgewebes.

In einem orientierenden Versuch wurde eine Kultur von *Gibberella Saubinetii* auf Pepton-Agar extrahiert. Der Nährboden enthielt 1 % rohes Pepton. Der Extrakt hatte eine atmungsbeschleunigende Wirkung, aber auch die Kontrolle-Flüssigkeit — d.h. der Extrakt des sterilen Nährbodens — erwies sich atmungsaktiv. Weitere Versuche ergaben, dass das Rohpepton diese Wirkung herbeiführt.

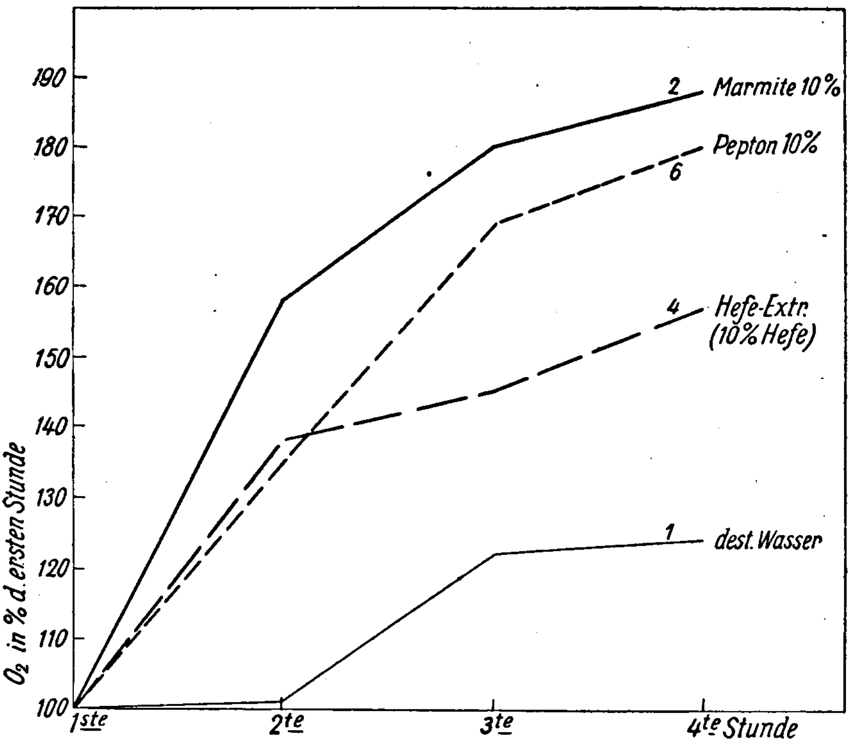
In den ungereinigten Handelspräparaten von Pepton sind Vitamin B_2 (Lactoflavin) und Bioskomponenten enthalten (ORLA-JENSEN, OTTE u. SNOG-KJAER, 1936). Sie stammen aus den proteolytischen Enzympräparaten, die bei der Peptonbereitung gebraucht werden.

Diese Tatsachen veranlassten uns zu Atmungsversuchen mit den vitamin- und biosreichen Hefeextrakten. In *Tabelle 50* und *Fig. 11*

TABELLE 50. (s. Fig. 11).

Versuch: 26-1-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 Pepton- oder Hefeextraktlösungen.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Wässeriger Hefeextrakt: 1 g Bäckerhefe in 10 cm^3 destilliertem Wasser aufgekocht und zentrifugiert (= 10 %); 10-fach verdünnt mit dest. Wasser (= 1 %).

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	62.8	100	122	124
2	Marmite, 10 %ige Lösung	62.0	158	180	188
3	„ 1 %ige „	60.0	121	134	142
4	wäss. Hefeextrakt 10 %	59.3	138	145	157
5	„ „ 1 %	59.7	122	131	137
6	Pepton, 10 %ige Lösung	59.2	135	169	180
7	„ 1 %ige „	57.1	111	132	142



Figur 11, s. Tabelle 50.

wird eine Versuchsreihe angeführt, aus der neben der Wirkung von Peptonlösungen der atmungsaktivierende Effekt zweier Hefeextrakte hervorgeht. Insonderheit das konzentrierte Handelshefepräparat „Marmite" ergab, als 10 %ige Lösung zugesetzt, eine starke Atmungserhöhung, die sich während des Versuchs ziemlich konstant erhielt (und zwar etwa 60 % über der Kontrolle). In Verdünnung sank der Effekt schnell, so dass — in einem anderen Versuch — eine 0.1 %ige Lösung nur noch eine gerade sichtbare Wirkung herbeiführte.

Auch aus dem Hefeextrakt konnte das aktive Prinzip durch Adsorption an Kohle entfernt werden (*Tabelle 51*). Hier tritt somit wieder einmal ein atmungserhöhender Faktor auf, der an Kohle adsorbierbar ist.

Die Ergebnisse der Versuche mit Extrakt I zeigten, dass sämtliche untersuchten Hyphenpilze aktive Stoffe im Myzel enthalten. In

TABELLE 51.

Versuch: 27-10-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Marmite-Lösung.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Kohlebehandlung: Marmite-Lösung mit Kohle (Carbo absorbens) behandelt und zentrifugiert.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff mm³/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	50.4	116	120	132	136
2	Marmite-Lösung	54.8	149	146	163	168
3	„ „ nach Kohlebehandlung	56.6	114	121	134	140

Hinsicht hierauf ist es hinterher nicht so befremdlich, dass auch Sprosspilzextrakte eine ähnliche Aktivität aufweisen. Die Tatsache jedoch, dass in Rohpepton und Hefeextrakt eine solche atmungsaktivierende Wirkung nachzuweisen ist und dass beide Vitamine und Bioskomponenten enthalten, brachte uns auf den Gedanken, dass zwischen diesen Wirkstoffen und dem atmungsaktivierenden Prinzip irgend eine Beziehung bestehen könne. Dies veranlasste uns zu einer Anzahl Atmungsversuche, in denen mehrere Vitamine und andere Wirkstoffe in reiner Beschaffenheit zur Anwendung kamen. Über diese Untersuchungen wird im neunten Abschnitt berichtet werden; zunächst wollen wir noch einige vergleichende Versuche mit den Rohextrakten besprechen.

2. Das Vorkommen des Aneurins in den Pilzextrakten.

Das Aneurin (Vitamin B_1, Thiamin) ist in vielen Hefen und Hyphenpilzen nachgewiesen worden (JANKE, 1939); es ist adsorbierbar an Kohle und zeigt eine hohe Hitzeresistenz. Manche Pilze bedürfen es für ihr Wachstum, ohne es synthetisieren zu können (SCHOPFER, 1934; FRIES, 1938). SCHOPFER zeigte, dass u.a. *Phycomyces Blakesleeanus* in einer Nährlösung, die nur Zucker und anorganische Salze enthält, ohne Zusatz von Aneurin nicht wächst, jedoch auf Spuren dieses Vitamins schon reagiert. Dieser Pilz lässt sich somit als Testorganismus zum Nachweis des Aneurins anwenden. Hiervon wurde im folgenden Kulturversuch, in dem die Extrakte I, III und B zur Prüfung auf Aneurin gelangten, Gebrauch

TABELLE 52. (*Phycomyces*-Kulturversuch).

Versuch: 6—12/12/38.
Kultur in 100 cm³-Erlenmeijerkölbchen, je mit 24 cm³ COONS-Nährlösung (SCHOPFER, 1935), 15 Minuten bei 118° C. autoklaviert, geimpft mit 0.1 cm³ einer Sporensuspension von *Phycomyces Blakesleeanus* (Stamm Wassink). Versuch bei Zimmertemperatur, im diffusen Tageslicht. Jedes Objekt mit einer Wiederholung.
Zugesetzte Flüssigkeiten: Aneurin = krist. Vitamin B_1 (F.L.)
Extr. I: 0.195 g Trockenmyzel (Kultur: 20/5—11/6/38) von *Gibberella Saubinetii* in 5 cm³ dest. Wasser extrahiert, zentrifugiert.
Extr. III: s. Tabelle 44.
Extr. B: „ „ „

Zusatz (1 cm³)	Wachstum nach 6 Tagen
destilliertes Wasser (Kontrolle)	Myzelspuren
Aneurin 0.023 γ p. cm³	submerses Myzel
„ 0.23 γ „	Luftmyzel
„ 2.3 γ „	„
„ 23.0 γ „	„
Extrakt I, Verdünnung 1 : 1000	submerses Myzel
„ „ 1 : 100	Luftmyzel
„ „ 1 : 10	„
„ unverdünnt	„
Extrakt III, unverdünnt	geringes submerses Myzel
Extrakt B, unverdünnt	Luftmyzel

gemacht (*Tabelle 52*). Es erwies sich, dass der Myzelextrakt (Extr. I) bereits in starker Verdünnung dem Testpilz das Wachstum ermöglichte. Zur Vergleichung wurde einigen Kulturkölbchen das reine Vitamin B_1 zugesetzt. Eine Menge von 0.23 γ Aneurin pro 25 cm³ Nährlösung genügte zur Bildung des Luftmyzels, während nach Zusatz von 0.023 γ das Wachstum sich auf ein submerses Myzel beschränkte. SCHOPFER stellte fest, dass der Pilz eine Mindestmenge von 0.0125 γ/25 cm³ für das Wachstum und 0.025 γ für die Luftmyzelbildung benötigte.

Der Extrakt III wies nur eine geringe wachstumsfördernde Wirkung auf, die sogar bedeutend hinter dem Effekt der Kontrolle (B = Extrakt des sterilen Kartoffelgewebes) zurückblieb. Diese Erscheinung wiederholte sich in anderen Versuchen und wir dürfen daraus den Schluss ziehen, dass das vom *Gibberella Saubinetii* befallene Kartoffelgewebe einen erheblich geringeren Aneuringehalt hat, als das gesunde Gewebe.

Nach GREWE (1937) enthalten Kartoffelknollen etwa 50 γ Aneurin

pro 100 g. Die Wirkung des Extrakts I im *Phycomyces*-Kulturversuch deutet darauf hin, dass *Gibberella Saubinetii* das Vitamin B_1 in Reinkultur auf RICHARDS-Nährlösung synthetisiert. *Gibberella Saubinetii* (= *Fusarium graminearum*) gehört somit zu den nicht-aneurinbedürftigen Pilzen (SCHOPFER (1938): auxo-autotroph) und es liegt nahe anzunehmen, dass dieser Pilz auch als Parasit das Vitamin synthetisiert und also den Aneuringehalt des Wirtgewebes nicht beansprucht.

Trotzdem beobachteten wir oben eine beträchtliche Verminderung der Aneurinwirkung des Gewebeextrakts nach der Erkrankung. (Extr. III im Vergleich mit Extr. B). Diese interessante Tatsache weist darauf hin, *dass ein grösserer Teil des anwesenden Vitamins, infolge des veränderten Stoffwechsels im kranken Gewebe, inaktiviert wurde.* Eine einfache Erklärung findet sich in der Möglichkeit, dass das alkali-empfindliche Aneurin durch die Alkalibildung im befallenen Kartoffelgewebe (hohes pH!) zerstört wird.

Aus dem Versuch geht jedenfalls hervor, dass die wachstumsfördernde Wirkung der Extrakte I, III und B nicht parallel mit ihrer atmungsaktivierenden Wirkung verläuft: nur I und B enthalten eine merkliche Menge Wachstumsfaktor für *Phycomyces*, während die Extrakte I und III mehr als B die Atmung des Kartoffelgewebes steigern. Auch in einem späteren Versuch mit dem Kohlefiltrat und Kohleeluat des Extrakts II von *Fusarium trichothecioides* zeigte das Filtrat (SfCf, s. Fig. 8) einen starken atmungserhöhenden Effekt und nur geringe Wachstumswirkung, im Gegensatz zum Eluat (SfCel), das eine Atmungshemmung ergab, zusammen mit einer ziemlich starken Wachstumsförderung im *Phycomyces*-Versuch.

Diese Ergebnisse deuten also darauf hin, dass das atmungsaktive Prinzip der Extrakte allerdings nicht mit dem *Phycomyces*-Wachstumsfaktor identisch ist. Wenn wir mit SCHOPFER dem Aneurin diese Wachstumswirkung zuschreiben, so kommen wir zu der Schlussfolgerung, dass Aneurin nicht für den Atmungseffekt verantwortlich ist.

3. Die Bioswirkung.

Die atmungsbeschleunigende Wirkung der Hefeextrakte lenkte unsere Aufmerksamkeit auf die Bioskomponenten. „Bios" ist nach WILDIERS (zitiert durch JANKE (1939)) in Wasser und in 80 %igem Alkohol löslich, jedoch unlöslich in absolutem Alkohol und Äther. Biotin, der wirksamste Teil des Bioskomplexes, ist thermostabil und adsorbierbar an Tierkohle; es kann durch Elution des Adsorbats mittels Aceton-Ammoniak wiedergewonnen werden (KÖGL u. TÖN-

NIS, 1936). Auf bestimmte biosarme Heferassen wirkt es als Wuchsstoff, z.B. auf die Mischhefe „M" des Instituts für Gärungsgewerbe in Berlin, unter Verwendung der Nährlösung von READER. Die anderen Bioskomponenten steigern nur die Wuchsstoffwirkung des Biotins und sind somit Co-Wuchsstoffe.

In einigen Testversuchen mit Menghefe „M" wurde die Bioswirkung der Extrakte I und II untersucht. Aus *Tabelle 53* gehen

TABELLE 53. (*Saccharomyces*-Kulturversuch).

Versuch: 24—31/1/39.
Kultur in 100 cm^3-Erlenmeijerkölbchen, je mit 19 cm^3 READERS Nährlösung, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 45 Minuten auf 100° erhitzt, geimpft mit 0.1 cm^3 einer Suspension (13 mg Hefe in 5 cm^3 dest. Wasser) von *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (Menghefe „M").
Versuchstemperatur: 25° C.
Jedes Objekt mit einer Wiederholung.
Zugesetzte Flüssigkeiten:
Extr. I: 0.5 g Trockenmyzel v. *Gibberella Saubinetii* in 20 cm^3 72 %-igem Alkohol extrahiert, zentrifugiert, eingedämpft und gelöst in 5 cm^3 dest. Wasser (Trockengewicht des Extrakts: 15.6 mg/cm^3).
Extr. II: Kulturflüssigkeit von *Gibberella Saubinetii* (Kultur: 31/10—21/11/38), teilweise Seitzfiltriert (II S).
Biotin: Biotinrohpräparat (KÖGL), enthaltend 2 γ/cm^3.

Zusatz (1 cm^3)	Sedimentationshöhe nach 7-tägiger Kultur, in mm.
destilliertes Wasser (Kontrolle)	—
Biotin, Verdünnung 1 : 2 (1 γ/Kolb)	1½—2½
„ „ 1 : 10 (0.2 γ/ „)	¼—½
„ „ 1 : 100 (0.02 γ/ „)	Spur
„ „ 1 : 1000 (0.002 γ/ „)	Spur
„ „ 1 : 10000 (0.0002 γ/ „)	—
Extr. I, Verdünnung 1 : 2	25—26
„ „ 1 : 10	17—18
„ „ 1 : 100	2—3
„ „ 1 : 1000	Spur
„ „ 1 : 10000	Spur
Extr. II	17—18½
„ II S	3—6
Richards-Lösung	Spur

die Resultate einer Versuchsreihe hervor. Nach 7-tägiger Kultur bei Anwesenheit der zugesetzten Flüssigkeiten wurde der Zuwachs auf volumetrische Weise bestimmt. Dazu wurden 5 cm^3 der Hefesuspension eine Minute mit einer bestimmten Geschwindigkeit in TROMMSDORFF-Röhrchen zentrifugiert. Die Hefezellen setzten sich in die Kapillare ab und die Sedimentationshöhe in mm diente dem

Wachstum zum Masstab. Die Extrakte I und II zeigten, im Gegensatz zu den Kontrolleflüssigkeiten (dest. Wasser und RICH. Lösung) eine deutliche Bioswirkung. Zur Vergleichung waren einigen Kölbchen verschiedene Mengen eines Biotinpräparats zugesetzt. Merkwürdigerweise übte das Biotin unter den obwaltenden Versuchsbedingungen nur in den höheren Konzentrationen eine wachstumsfördernde Wirkung aus. Mit reinem kristallisierten Biotin kamen wir in einem späteren Versuch zum gleichen Ergebnis: nur geringer Zuwachs nach einem Zusatz von 0.2—0.8 γ Biotin pro 20 cm^3 Nährlösung. Offenbar eignet unsere einfache Methode sich nicht zum Nachweis der Biotinwirkung, falls andere Bioskomponenten fehlen.

Eine Bestätigung der Biosaktivität des Extrakts I verdanken wir Herrn Dr. TH. J. DE MAN, seiner Zeit Mitarbeiter von Prof. KÖGL, der so freundlich war den Extrakt nach der Methode von KÖGL u. TÖNNIS (1936) zu testen. Ein Extrakt, bereitet aus 1 g Trockenmyzel in 10 cm^3 destilliertem Wasser, wies eine Bioswirkung von 2500 S.E./cm^3 auf. Die Bioswirkung des Myzelextrakts steht somit fest und es fragte sich nun wie sie sich zu der atmungsbeförndernden Wirkung der *Gibberella*- und Hefeextrakte verhält.

Damit beide Wirkungen eingehender verglichen werden konnten, zerlegten wir diese Extrakte nach der von VAN HULSSEN (1936) beschriebenen Methode in eine Anzahl Fraktionen: neutrale und basische Bleifällung, Filtrat der Bleisalzfällung, Kohlefiltrat und Kohleeluat. Diese Fraktionen gelangten sowohl im Hefetest als im Atmungsversuch zur Prüfung. Die Ausführung der Fraktionierung erhebt keinen Anspruch auf quantitative Fällung, Adsorption und Elution. Sie beabsichtigte nur die Zerlegung der Extrakte in Teile verschiedener Wirksamkeit (qualitativ).

In *Tabelle 54* folgt eine Übersicht der Versuchsresultate. Der Hefezuwachs wird wieder in mm Sedimentationshöhe ausgedrückt; der Atmungseffekt in der mittleren prozentualen Erhöhung der Atmung pro Stunde während der drei Stunden nach Zusatz der zu untersuchenden Flüssigkeiten (es werden die Grenzen angegeben, innerhalb deren die Ergebnisse in den Wiederholungen variierten).

Den Resultaten VAN HULSSENS entsprechend, zeigen von den Hefeextraktfraktionen das Filtrat der Bleifällung und das Kohleeluat die höchste Biosaktivität. Beide Flüssigkeiten üben auch einige atmungserhöhende Wirkung aus, aber nicht viel mehr als die alkalische Bleifällung, die jedoch nur geringe Bioswirkung aufweist. Es ergibt sich somit, dass das atmungsaktivierende Prinzip mehr oder weniger gleichmässig auf die Fraktionen verteilt ist (mit Ausnahme des Kohlefiltrats), während die Bioswirkung wesentlich nur im Bleifiltrat anwesend ist, aus dem der wirksame Stoff an Kohle adsorbiert

TABELLE 54. Vergleichende Versuche mit fraktionierten Hefe- und *Gibberella*-myzelextrakten.

Versuche: Februar 1939.
Hefekulturversuche: Kultur in 100 cm^3-Erlenmeijerkölbchen, je mit 19½ cm^3 READERS Nährlösung und ½ cm^3 Extrakt oder dest. Wasser, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 45 Minuten auf 100° C. erhitzt, geimpft mit 1 cm^3 einer Suspension von *Saccharomyces cerevisiae* (Menghefe „M") in dest. Wasser (< 1 mg Hefe/cm^3). Versuchstemperatur: 25° C. Jedes Objekt mit einer Wiederholung. Kulturdauer: 3—5 Tage.
Atmungsversuche: Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Eigenheimer" oder „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2). Schnitten gewässert.
Birne: 0.3 cm^3 Extrakt oder dest. Wasser.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Extrakte: 1. Hefekochsaft: 100 g Bäckerhefe in 400 cm^3 dest. Wasser 10 Minuten bei 120° C. autoklaviert, filtriert.
2. *Gibberella*-Myzelextrakt: 4 g Trockenmyzel (Kultur: 31/10—21/11/38) in 40 cm^3 dest. Wasser 45 Minuten auf 100° C. erhitzt, zentrifugiert, eingedämpft, mit 30 cm^3 80 %igem Alkohol ausgeschüttelt. Alkoholische Lösung eingedämpft, gelöst in dest. Wasser.
Fraktionierung: nach VAN HULSSEN (1936).

Zusatz	*Saccharomyces*-Kulturversuch Sedimentationshöhe	Atmungsversuch Mittlere Erhöhung über der Kontr.
1. *Hefekochsaft.*		
destilliertes Wasser	Spur	—
Rohkochsaft	20½	29—51%
neutrale Bleisalzfällung	7½—8½	3—15%
basische Bleisalzfällung	¼—1½	8—18%
Filtrat der Bleisalzfällung	23—30	14—18%
Kohlefiltrat	Spur	0— 4%
Kohleeluat	20—21	10%
2. *Extrakt I v. Gibberella Saubinetii.*		
destilliertes Wasser	Spur	—
Rohkochsaft	23	43—51%
löslich in 80 %igem Alkohol	19½	36—46%
unlöslich in 80 %igem Alkohol	8	18%
neutrale Bleisalzfällung	3½	6— 8%
basische Bleisalzfällung	2—4	4— 8%
Filtrat der Bleisalzfällung	10	10—13%
Kohlefiltrat	Spur	8—11%
Kohleeluat	¼—3	8—16%
Kohlefiltrat + -eluat	2—4	12%
Kohlefiltrat + bas. Bleifällung	3½—4	14%
Kohleeluat + bas. Bleifällung	12—13	11%

wird. Es sieht aus, alsob die atmungsaktive Substanz teilweise vom Schwermetallsalz gefällt wird. Wir glauben jedoch vielmehr die Aktivität der Bleisalzfällungen auf Adsorption der aktiven Stoffe zurückführen zu können.

Im Falle des *Gibberella*-Extrakts (Extr. I) bildete der in 80 %igem Alkohol lösliche Teil des wässerigen Extrakts die Ausgangsflüssigkeit. Der Aktivitätsverlust, der schon hierbei auftritt, prägt sich noch besonders aus bei der weiteren Bearbeitung des Extrakts, so dass das Kohleeluat nur noch einen kleinen Bruchteil der ursprünglichen Bioswirkung zeigt. Das Filtrat der Bleisalzfällung erzielt auch hier die höchste Biosaktivität; entsprechende Differenzen in der Aktivität der Fraktionen lassen sich in den Atmungsversuchen nicht nachweisen. Der Verlauf der Atmungsversuche gibt auch keineswegs Veranlassung zu der Annahme, dass der Atmungseffekt irgendwo von einer Hemmung verdeckt wird.

Die Ergebnisse erlauben den Schluss, dass keine korrelative Beziehung zwischen dem Vorkommen der Hefewachstumsfaktoren und dem Auftreten des atmungsaktivierenden Prinzips in den verschiedenen Stufen der Hefe- und Pilzextraktreinigung vorliegt. Ausserdem geht aus diesen Versuchen hervor, dass diese Fraktionierung, ursprünglich ausgearbeitet als Reinigungsverfahren zur Anreicherung des Biotins, sich nicht für die Reinigung und Anreicherung des atmungsaktiven Prinzips eignet.

ABSCHNITT IX.

DER EINFLUSS EINER ANZAHL CHEMISCHER VERBINDUNGEN AUF DIE ATMUNG DES KARTOFFELGEWEBES.

1. Vitamine, Bioskomponenten und andere Wirkstoffe.

Wie bereits erwähnt gab die atmungserhöhende Wirkung der wirkstoffreichen Pepton- und Hefepräparate Veranlassung zur Feststellung des Einflusses bestimmter Wirkstoffe auf die Atmung. Die Resultate der *Phycomyces*- und *Saccharomyces*-Versuche im vorigen Abschnitt wiesen jedoch schon darauf hin, dass weder das Aneurin, noch das Biotin an sich mit der atmungsaktivierenden Wirkung der Rohextrakte verbunden ist. Gleichzeitig mit letzteren Versuchen wurde eine Reihe synthetischer und isolierter Wirkstoffe und hochaktiver Präparate auf ihre Wirksamkeit geprüft.

Die Möglichkeit, dass die Vitamine B_1, B_2 oder C direkt oder indirekt die Atmungsgeschwindigkeit beeinflussen, war von vorn-

herein nicht ausgeschlossen. Alle drei sind sie als Redoxkatalysatoren erkannt worden und spielen wahrscheinlich eine Rolle bei biologischen Oxydo-Reduktionen (FISCHER, 1939). Wie LOHMANN (1937) nachwies, ist die Diphosphorsäureverbindung (Pyrophosphat) des Aneurins (Vitamin B_1) als Co-Enzym der Carboxylase zu betrachten. Es katalysiert somit die CO_2-Abspaltung aus Brenztraubensäure und ist also an der anaeroben Atmung beteiligt.

Die Wirksamkeit des Lactoflavins (Vitamin B_2) in phosphorsäurer Bindung als prosthetische Gruppe (Co-Enzym) des WARBURGschen „Gelben Atmungsferments" ist bekannt. Auch halten geringe Mengen dieses Wirkstoffes die Atmung von Leuchtbakterien in Gang (DOUDEROFF, 1938).

Ascorbinsäure (Vitamin C) scheint mit Peroxydase, Katalase und wahrscheinlich auch Sulfhydrilverbindungen ein kombiniertes Redoxsystem zu bilden, dass bei den Hydrierungs- und Dehydrierungsprozessen der Zelle eine Rolle spielt (JANKE, 1939).

Aus einer Versuchsreihe mit einem Aneurin-Präparat (Fullererde-Adsorbat) ergab sich tatsächlich ein positives Resultat. Das Adsorbat wurde in destilliertem Wasser suspendiert, geschüttelt und zentrifugiert oder filtriert. Die Flüssigkeit, die trotzdem noch eine

TABELLE 55.

Versuch: 16-11-38.
Hauptraum: 60 Schn. v. ½ mm, „Eigenheimer", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.6 cm^3 dest. Wasser oder Adsorbatextrakt.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.
Zusatz: Aneurin-Fullererdeadsorbat (B.D.H.) 2 g (= 200 intern. Einheiten) in 10 cm^3 dest. Wasser geschüttelt, zentrifugiert, filtriert. Mit destilliertem Wasser verdünnt.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff			
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde		
		1. St.	2.	3.	4. St.
1	dest. Wasser	51.3	106	111	121
2	extr. Aneurinadsorbat unverdünnt	50.3	145	142	161
3	„ „ Verdünnung 1 : 10	48.3	126	130	142
4	„ Aneurinadsorbat Verdünnung 1 : 100	50.4	118	121	132
5	„ Aneurinadsorbat Verdünnung 1 : 1000	49.4	115	119	127

feine Trübung zeigte, gelangte in verschiedenen Verdünnungen zur Prüfung (*Tabelle 55*). Aus den Ergebnissen dieser Versuche geht hervor, dass auch in starker Verdünnung noch eine atmungserhöhende Wirkung auftritt und dass diese Erhöhung während der Versuchsdauer beibehalten bleibt. Das Präparat enthielt 100 Taubentagesdosen pro Gramm; jede dieser tierphysiologischen Einheiten entspricht etwa 2 γ Vitamin B_1 (GREWE, 1937). Gefäss 5, dem die niedrigste Konzentration zugesetzt wurde, erhielt somit höchstens 0.012 Einheit oder 0.024 γ Aneurin.

Die Aktivität des Adsorbats bestätigte sich in weiteren Versuchen; das wirksame Prinzip erwies sich thermostabil und besser eluierbar oder löslich in Wasser als in absolutem Alkohol. Auch steigerte es die Atmung frischgeschnittener Scheibchen. Die Atmungsintensität des Kartoffelgewebes ist in destilliertem Wasser niedriger als in Phosphatpufferlösung (s. Abschn. III-2c), aber die Wirkung des Vitamin-Präparats war in ersterem Milieu relativ stärker.

Der R.Q. empfand keine Veränderung (er betrug resp. 0.98 und 1.04 in 2 Versuchen), während bei Anwesenheit von KCN (1 : 25.000) keine Atmungserhöhung mehr auftrat. Diese Resultate entsprechen unseren Erfahrungen mit dem atmungsaktivierenden Prinzip des Myzelextrakts (Extr. I).

Die Wirksamkeit dieses Vitamin-Präparats ist dennoch nicht dem Aneurin-Gehalt zuzuschreiben. Die Versuche, über die im vorigen Abschnitt berichtet wurde, machten eine vermeintliche Identität des wirksamen Prinzips im Extrakt I mit Aneurin bereits sehr zweifelhaft. Die nächste Stufe der Untersuchung — der Test mit dem reinen, kristallisierten Vitamin B_1 — ergab, dass das Vitamin in den verschiedenen geprüften Konzentrationen — mit Ausnahme der sehr hohen Konzentration 1 : 50 — völlig effektlos ist. Die Aktivität des Vitamin-Rohpräparats muss daher auf die Wirkung der dem Adsorbat als Verunreinigung anhaftenden Stoffen zurückgeführt werden. Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung des Vitamins findet neben Reiskleie oft Hefe Anwendung. Angesichts der atmungsaktivierenden Wirkung der Hefeextrakte würde das Vorkommen des wirksamen Prinzips im Fullererde-Adsorbat hinterher nicht befremden, falls das vorliegende Präparat aus Hefe bereitet wurde.

Die Bemühungen zur Identifizierung der wirksamen Stoffe mit irgend einem Wirkstoff wurden inzwischen fortgesetzt. Dazu wurde eine Anzahl der am meisten in Betracht kommenden Wirkstoffe auf ihre Wirkung im Atmungsversuch getest. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in *Tabelle 56* kurz zusammengefasst. Der Atmungs-

effekt wird auch in dieser Tabelle ausgedrückt als mittlere Erhöhung (über die der Kontrolle) in den drei Stunden nach Zusatz der zu untersuchenden Stoffe.

Diese Vereinfachung ist nur zulässig, solange die Atmungserhöhung sich in dieser Zeit wenig ändert. Dies traf nach Zusatz von Ascorbinsäure nicht zu und daher werden in diesem Falle die Erhöhungen in den aufeinanderfolgenden Stunden erwähnt. Die Bezeichnung: „keine Erhöhung" bedeutet, dass der mittlere Effekt innerhalb der Fehlergrenzen (etwa 4 %) liegt. Die Herkunft der Chemikalien wird in Klammern angegeben. B.D.H. = British Drug House; F.L. = Fraenkel u. Landau. Die mit (K) bezeichneten Stoffe wurden uns freundlichst vom Herrn Prof. Dr. F. Kögl zur Verfügung gestellt.

TABELLE 56.

Versuchs-Datum	zugesetzte Stoffe	Menge pro Gefäss	Atmungseffekt (mittlere Erhöhung)
23-11-38	Glutathion (B.D.H.)	3.0 mg	7 %
	„	0.0003—0.3 mg	keine Erhöhung
24-11-38	Inosit (B.D.H.)	0.03—3.0 mg	keine Erhöhung
	Nicotinsäure (B.D.H.)	3.0 mg	zunehmende Hemmung
	„	0.03—0.3 mg	keine Erhöhung
6-12-38	krist. Aneurin (F.L.)	0.07 mg	10 %
	„ „	0.00007—0.007 mg	keine Erhöhung
7-12-38	„ „	0.0007 mg	keine Erhöhung
	Inosit (B.D.H.)	3.0 mg	keine Erhöhung
	„ (F.L.)	3.0 mg	keine Erhöhung
	krist. Aneurin (F.L.) + Inosit (B.D.H.)	0.0007 mg 2.0 mg	keine Erhöhung
	krist. Aneurin (F.L.) + Inosit (F.L.)	0.0007 mg 2.0 mg	keine Erhöhung
9-12-38	krist. Aneurin (F.L.) + Glutathion (B.D.H.) + Nicotinsäure (B.D.H.)	0.0007 mg 0.3 mg 0.0006 mg	keine Erhöhung
	krist. Aneurin (F.L.) + Glutathion (B.D.H.) + Inosit (F.L.)	0.0007 mg 0.3 mg 3.0 mg	keine Erhöhung
	krist. Aneurin (F.L.) + Nicotinsäure (B.D.H.) + Inosit (F.L.)	0.0007 mg 0.0006 mg 3.0 mg	keine Erhöhung
	krist. Aneurin (F.L.) + Glutathion (B.D.H.) + Nicotinsäure (B.D.H.) + Inosit (F.L.)	0.0007 mg 0.2 mg 0.0004 mg 2.0 mg	keine Erhöhung
21-12-38	krist. Aneurin (F.L.) + Brenztraubensäure	0.0048 mg 0.6 mg	keine Erhöhung

TABELLE 56. (Fortsetzung)

Versuchs-Datum	zugesetzte Stoffe	Menge pro Gefäss	Atmungseffekt (mittlere Erhöhung)
19-1-39	Biotinpräparat (K)	0.003 mg Biotin	7 %
20-1-39	Lactoflavin (K)	0.003 mg	keine Erhöhung
	Biotinpräparat (K)	0.0006 mg Biotin	keine Erhöhung
	Lactoflavin (K)	0.001 mg	keine Erhöhung
	+ Biotinpräparat (K)	0.0004 mg Biotin	
25-1-39	Biotinpräparat (K)	0.003 mg Biotin	keine Erhöhung
	+ Aneurin (F.L.)	0.006 mg	
	+ Inosit (B.D.H./F.L.)	2.0 mg	
	Lactoflavin (K)	0.003 mg	keine Erhöhung
	+ Aneurin (F.L.)	0.006 mg	
	+ Inosit (B.D.H./F.L.)	2.0 mg	
	Dieselbe Kombinationen		keine Erhöhung
	+ Asparagin	10.0 mg	
15-2-39	Biotinpräparat (K)	0.01 mg Biotin	9 %
	Biotinpräparat (K)	0.005 mg Biotin	13 %
	+ Inosit (B.D.H.)	0.5 mg	
	Biotinpräparat (K)	0.005 mg Biotin	13 %
	+ Lactoflavin (K)	0.005 mg	
	+ Aneurin (F.L.)	0.008 mg	
	+ Inosit (B.D.H.)	0.4 mg	
16-2-39	Biotinpräparat (K)	0.01 mg Biotin	7 %
	Biotinpräparat (K)	0.01 mg Biotin	11 %
	+ Inosit (B.D.H.)	2.0 mg	
23-2-39	reines Biotin (K)	0.002 mg	keine Erhöhung
	reines Biotin (K)	0.002 mg	keine Erhöhung (4 %)
	+ Inosit (B.D.H.)	1.0 mg	
	reines Biotin (K)	0.002 mg	11 %
	+ Inosit (F.L.)	1.0 mg	
3-3-39	reines Biotin (K)	0.004 mg	9 %
	Inosit (F.L.)	0.8 mg	keine Erhöhung (4 %)
	reines Biotin (K)	0.004 mg	9 %
	+ Inosit (F.L.)	0.8 mg	
	Aneurin (F.L.)	0.03 mg	8 %
	reines Biotin (K)	0.004 mg	keine Erhöhung (4 %)
	+ Inosit (F.L.)	0.8 mg	
	+ Aneurin (F.L.)	0.03 mg	
9-8-39	Ascorbinsäure	3.0 mg	148, 127, 37 u. 8 % in 4 St.
	„	0.3 mg	39, 4, 6 u. 1 % in 4 St.
	„	0.03 mg	5, 0, 2 u. 1 % in 4 St.
	„	0.003 mg	keine Erhöhung

Überblicken wir die Ergebnisse, so fällt es zunächst auf, dass in keinem Falle — ausgenommen nach Zusatz von Ascorbinsäure — ein bedeutender Atmungseffekt hervorgerufen wird. Glutathion führt (wie Aneurin) nur in physiologisch sehr hoher Konzentration eine geringe Mehratmung herbei. Dabei bleibt noch unentschieden, ob der Sauerstoffmehrverbrauch nicht dem von diesen Redoxsystemen selbst gebundenen Sauerstoff zuzuschreiben ist.

Die meisten Versuche, in denen Biotin zugesetzt wurde, ergaben eine geringe Atmungserhöhung. Die Biotinpräparate wurden im Kühlschrank aufbewahrt und vorsichtshalber — damit der Aktivität der kleinen Flüssigkeitsmengen nicht geschadet wurde — nicht jedesmal aufgekocht. Die Möglichkeit einer Bakterienentwicklung war somit nicht ganz ausgeschlossen. Weder in physiologisch sehr hoher Konzentration ($10\ \gamma = 1 : 3 \times 10^5$), noch in Kombination mit Aneurin, Lactoflavin und Inosit wurde ein Effekt, grösser als 10 % Erhöhung, erzielt.

Der auffallende Effekt von Ascorbinsäure — ein bedeutender, aber schnell abnehmender Sauerstoffmehrverbrauch — liess vermuten, dass es sich hier nicht um eine Steigerung der Kartoffelatmung, sondern um eine Oxydation der Ascorbinsäure handelt. Es stellte sich bald heraus, dass eine ähnliche „Atmungskurve" bei Anwendung zerriebenen Kartoffelgewebes (Gewebebrei) nach Zusatz von Ascorbinsäure auftritt. 30 Kartoffelschnitten wurden dazu im Mörser zerrieben und mit 2 cm^3 Phosphatpuffer in ein Atmungsgefäss eingefüllt. Der Sauerstoffverbrauch betrug 9.1 mm^3 in der ersten Stunde und stieg — nach Zusatz von 3 mg Ascorbinsäure — bis auf 107.9 mm^3 in der zweiten Stunde, während er in den folgenden Stunden zurückging auf resp. 49.4, 5.9 und 2.3 mm^3. Ausserdem wurde noch der Atmungsquotient unverletzter Kartoffelscheibchen nach Zusatz von 3 mg Ascorbinsäure festgestellt. Der erzielte Wert von 0.63 in den zwei ersten Stunden zeigt, dass die Sauerstoffaufnahme der Kohlensäureproduktion erheblich überlegen war.

Aus diesen Tatsachen geht hervor, dass der Effekt der Ascorbinsäure nicht in erster Linie auf eine gesteigerte Atmungsgeschwindigkeit des Kartoffelgewebes, sondern auf eine irreversible Oxydation des Vitamins — und zwar unter Mitwirkung der cellulären Redoxkatalysatoren — zurückgeführt werden darf. Dabei bildet sich offenbar ein (hinsichtlich der Atmung) unwirksames Oxydationsprodukt, denn es ergab sich, dass die Atmung des Kartoffelgewebes sich nach Beendigung des Oxydationsvorgangs auf dem Niveau der Kontrolle aufrecht erhalten hatte.

Zusammenfassend können wir sagen, dass keiner der getesten chemischen Stoffe und keine der angewandten Kombinationen eine atmungserhöhende Wirkung ausübt, die zu der Annahme eines Zusammenhangs zwischen diesen Stoffen und dem wirksamen Prinzip der Pilzextrakte Veranlassung geben könnte. Die Versuche zur Identifizierung des fraglichen Prinzips mit einem der genannten Wirkstoffe hatten somit ein negatives Ergebnis. Inzwischen bestätigen die Resultate dieser Versuchsreihe die Ergebnisse des vorigen Abschnitts, die bereits darauf hinwiesen, dass weder dem Aneurin-, noch dem Biotingehalt der aktiven Extrakte die atmungsbeschleunigende Wirkung dieser Flüssigkeiten zugeschrieben werden kann.

2. **β-Indolyl-Essigsäure (Heteroauxin).**

Die Versuche mit diesem Wuchsstoff nehmen in vorliegender Untersuchung eine gesonderte Stelle ein, da es von vornherein unwahrscheinlich war, dass dieser ätherlösliche Wirkstoff in Kausalzusammenhang mit dem atmungsaktivierenden Effekt der Pilzextrakte stehen würde.

Zwar ist Heteroauxin in Hefe und in vielen Hyphenpilzen aufgefunden worden (JANKE, 1939) und wurde auch die Anwesenheit von Wuchsstoff im Myzelextrakt von *Gibberella Saubinetii* durch ein positives Resultat im *Avena*-Koleoptil-Test (dessen Ausführung wir der Bereitwilligkeit des Herrn Dr. M. H. v. RAALTE verdanken) nachgewiesen. Ausserdem hat REINDERS (1938) gefunden, dass Kartoffelscheibchen unter Einfluss von Heteroauxin einen erhöhten Trockengewichtsverlust aufweisen. Sie schliesst hieraus, dass diese Erscheinung auf eine gesteigerte Atmung zurückgeführt werden muss.

Schliesslich führt Heteroauxin nach THIMANN u. SWEENEY (1937) in niedrigen Konzentrationen eine Beschleunigung der Protoplasmaströmung von Hafer-Koleoptilen herbei. Diese Wirkung fängt sofort nach Zusatz des Wuchsstoffes an, verschwindet jedoch nach kurzer Zeit (etwa 30 Minuten) wieder. Bei Konzentrationen über 1 auf 2×10^6 tritt dagegen eine — gleichfalls vorübergehende — Verlangsamung der Plasmaströmung auf. In einem späteren Bericht (SWEENEY u. THIMANN, 1938) stellen diese Forscher fest, dass die genannten Effekte bei genügendem Kohlehydratzusatz von längerer Dauer sind, während die Strömungshemmung bei höheren Wuchsstoffkonzentrationen durch Sauerstoffmangel herbeigeführt werden soll, und zwar dadurch, dass Heteroauxin — wie sie meinen — die Atmung erhöht. Sie versuchen diese Erscheinungen durch die Annahme zu erklären, dass Heteroauxin, neben der sauerstoffverbrauchenden Plasmaströmung, noch einen zweiten Atmungsvorgang —

der hinsichtlich des verfügbaren Sauerstoffs Vorrang hat — anregt.

Wie dem auch sei, es war allerdings denkbar, dass Heteroauxin, via den Plasmaströmungseffekt, auch die Atmung des Kartoffelgewebes beeinflussen könnte. Obwohl Heteroauxin durch Ätherlöslichkeit gekennzeichnet wird und das atmungsaktivierende Prinzip des Pilzextrakts keine oder nur geringe Ätherlöslichkeit aufweist, lag es nach obigen Ausführungen nahe, die Wirkung des Wuchsstoffs sicherheitshalber im Atmungsversuch festzustellen. Heteroauxin wurde dazu in verschiedenen Konzentrationen dem Kartoffelgewebe zugesetzt, teils mit gleichzeitiger Zugabe von Glukose (*Tabelle 57*).

TABELLE 57.

Versuche: 13 u. 14-4-39.
Hauptraum: 30 Schn. v. 1 mm, „Bintje", in Phosphatpuffer (pH 6.2).
Birne: 0.3 cm^3 dest. Wasser oder Heteroauxin-Lösung.
Einsatz: 0.4 cm^3 KOH 25 %.
Vorbehandlung: gewässert.

Gefäss Nr.	Zusatz	verbrauchter Sauerstoff				
		mm^3/Stunde	in Proz. d. ersten Stunde			
		1. St.	2.	3.	4.	5. St.
1	dest. Wasser	55.4	103	106	107	114
2	„ „	54.9	103	101	106	111
3	Heteroauxin 60 γ (2 : 10^5)	59.5	101	94	98	105
4	„ 6 γ (2 : 10^6)	58.8	104	110	110	119
5	„ 0.6 γ (2 : 10^7)	57.2	109	108	111	114
6	„ 0.06 γ (2 : 10^8)	58.0	105	106	108	114
7	„ 0.006 γ (2 : 10^9)	53.5	108	104	109	114
1	Glukose 3 mg	54.4	123	131	140	
2	„ 3 „	55.8	120	130	136	
3	Glukose 3 mg + Heteroauxin 3 γ	58.3	125	132	139	
4	Glukose 3 mg + Heteroauxin 0.3 γ	57.0	120	127	135	

Es stellte sich heraus, dass in unseren kurz währenden Versuchen die Atmung keinen reellen Einfluss seitens des Wuchsstoffes erfuhr, ausgenommen nach Zusatz grösserer Dosen ($60\,\gamma = 1 : 5 \times 10^4$), bei dem eine Atmungshemmung auftrat. Es bleibt immerhin möglich, dass von Heteroauxin in lange dauernden Versuchen — wie im Falle REINDERS — schliesslich eine Atmungsbeschleunigung hervorgerufen wird, aber auch in solchem Falle würde zur Annahme eines Kausalzusammenhangs zwischen dem Vorkommen des Heteroauxins im Pilzmyzel und der atmungsaktivierenden Wirkung des Pilzextrakts

kein Grund vorliegen, weil es sich bei letzterer ja um einen sofort einsetzenden Effekt handelt.

Glukosezusatz ändert die Lage nicht; für Kartoffelgewebe gilt somit nicht der Zusammenhang zwischen Heteroauxin, Plasmaströmung und Atmung, der nach THIMANN u. SWEENEY für junge Hafer-Koleoptile bestehen soll. Die Atmungshemmung in unserem Versuch bei Anwendung höherer Wuchsstoffkonzentrationen wäre allerdings auf eine Verlangsamung der Plasmaströmung zurückzuführen, wie diese bei Hafer-Koleoptilen auftritt. Nur wäre bei Gebrauch von Kartoffelgewebe eine 40-mal höhere Konzentration zum Erzielen dieses Effekts benötigt.

3. Histidin.

Die Eventualität eines Zusammenhangs zwischen Atmungserhöhung und Beschleunigung der Plasmaströmung führte zu einigen Atmungsversuchen mit l-Histidin (Base). FITTING (1936) erzielte mit diesem Stoff eine Auslösung der Plasmaströmung in *Vallisneria*. Unsere Versuche, in denen l-Histidin in 7 Konzentrationen zwischen $1 : 10^9$ und $4 : 10^4$ auf ihre Wirkung getest wurde, ergaben ein völlig negatives Resultat; 3 Stunden nach Zusatz des Histidins zeigte die Atmung der Kartoffelscheibchen noch keine Spur eines Einflusses.

4. Andere Stoffe.

Es folgt jetzt noch eine Übersicht der Versuche mit einer Anzahl verschiedener Stoffe, die entweder als Stoffwechselprodukte der Pilze, oder als atmungsaktive Stoffe als Vergleichsobjekt in Betracht kamen.

a. *Amine.* Mehrere Forscher beschäftigten sich bereits mit dem Studium der toxischen Stoffe, die von Pilzen gebildet werden. Meistens bedienten sie sich dabei von Pilzen, die in Reinkultur gezogen wurden. Insbesondere die Gruppe der Welkekrankheitserreger ist in diese Untersuchungen bezogen worden, da die Krankheitssymptome — das Welken der Wirtspflanze — der Giftwirkung der vom Welkeparasiten in der Wirtspflanze ausgeschiedenen Toxine zugeschrieben werden. In Reinkultur werden von vielen Pilzen Stoffe ausgeschieden, die das Welken oder vielmehr die Vergiftung von Pflanzen, die in die Kulturflüssigkeit oder in den Pilzextrakt eingesetzt werden, herbeiführen. AHMET (1933) beschäftigte sich mit den Kulturflüssigkeiten und Myzelextrakten von *Fusarium lycopersici* (= *F. bulbigenum* Cke. et Mass. var. *lycopersici* (Brushi) Wr.) und *Fusarium vasinfectum*. Diese Pilze wurden auf RICHARDS-Nährlösung gezogen. Er gelangte zu der Überzeugung, dass es sich bei der toxischen Wirkung der genannten Flüssigkeiten um Amine handelt. Manche

synthetische Amine riefen tatsächlich Welkeerscheinungen hervor. Das toxische Prinzip war thermostabil und nicht flüchtig; es war löslich in Methyl- und Äthylalkohol und unlöslich in Äther. In der Toxinlösung konnten keine reduzierenden Stoffe — also keine Aldehyde — nachgewiesen werden. Die basisch reagierende Kulturflüssigkeit verlor ihre Toxidität nach neutralisieren nicht.

Diese Eigenschaften stehen mit jenen des atmungserhöhenden Prinzips unserer Pilzextrakte nicht im Widerspruch. Daher wurde untersucht, ob möglicherweise auch in den Atmungsversuchen die Wirkung der Extrakte auf Amine zurückgeführt werden könnte.

Während die Toxinlösungen AHMETs gegen Ninhydrin positiv reagierten — womit die Anwesenheit primärer Aminogruppen nachgewiesen wurde — fiel die Farbreaktion nach RIMINI (SCHOORL, 1937) auf primäre und sekundäre (aliphatische) Amine in den Kulturflüssigkeiten von *Gibberella* und *Fusarium trichothecioides* negativ aus (s. Seite 236). Einige synthetische primäre und sekundäre Amine wurden in Atmungsversuchen getest (s. *Tabelle 58*). Es ergab sich,

TABELLE 58.

Versuchsdatum	zugesetzter Stoff	Menge pro Gefäss	Atmungserhöhung in % d. ersten Stunde		
			2.	3.	4. St.
a. *Amine.*					
15-5-39	Isobutylamin	1.5 mg	keine Erhöhung		
„	Hexylamin	2.0 mg	3	11	13
7-3-39	Diäthylamin	3.0 mg	keine Erhöhung		
2-3-39	Diphenylamin	< 15.0 mg	3	19	19
b. *Ammoniumsalze und Harnstoff*					
15-3-39	Ammoniumnitrat	3.0 mg	keine Erhöhung		
„	Ammoniumsulfat	3.0 mg	keine Erhöhung		
7-3-39	Harnstoff	3.0 mg	keine Erhöhung		
c. *Aminosäuren.*					
15-3-39	Glykokoll	1.5 mg	3	5	8
21-3-39	Leucin	1.5 mg	keine Erhöhung		
„	Glutaminsäure	1.5 mg	keine Erhöhung		
15-3-39	Cystin	< 0.3 mg	4	12	6
„	l-Tyrosin	< 0.3 mg	keine Erhöhung		
d. *Phenolderivate.*					
2-3-39	p-Phenylendiamin	15.0 mg	49	60	64
„	„	1.5 mg	16	34	70
7-3-39	„	1.5 mg	17	39	
„	„	0.15 mg	10	43	
„	„	0.015 mg	10	29	
15-5-39	p-Oxyphenylglycin	< 1.5 mg	24	64	30
17-5-39	„	< 1.5 mg	27	27	54

dass Isobutyl- und Diäthylamin keinen Effekt hervorrufen, während Hexyl- und Diphenylamin einen wahrnehmbaren Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch ausüben und zwar erst in der dritten Stunde. Es handelte sich hier jedoch um ziemlich hohe Konzentrationen; die zugesetzte Diphenylaminlösung war gesättigt.

Neben den Atmungsversuchen wurde eine Reihe **Welkeversuche** angestellt, die hier nur beiläufig erwähnt werden können. Darin setzten wir abgeschnittene Pflanzen (Tomate, Erbsen und Bohnen) in die Kulturflüssigkeiten der Pilze und in Hexylaminlösung (0.25%) ein. Die Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen AHMETS: das Amin hat eine starke Giftwirkung, ebenso wie die Kulturflüssigkeiten von *Fusarium bulb. var. lycopersici* und vor allem von *Fusarium trichothecioides* (s. **Tafel V**). Wir bringen in Erinnerung, dass der Extrakt II (die Kulturflüssigkeit) von *F. trichothecioides* neben dem atmungsaktivierenden einen atmungshemmenden Faktor enthält und dass es gelang beide Faktoren zu trennen. Die Welkeversuche ergaben, dass die Extraktfraktionen mit dem Hemmungseffekt zugleich ein starkes Welken herbeiführen, während die Pflanzen in den atmungsaktivierenden Fraktionen keine Welkeerscheinungen aufweisen.

Wir glauben aus diesen Tatsachen schliessen zu dürfen, dass, wenn auch die Kulturflüssigkeiten Amine enthalten sollten, letztere nicht mit der Atmungsaktivierung der Extrakte im Zusammenhang stehen.

b. *Ammoniumverbindungen.* Zu den Stoffen, die als Stoffwechselprodukte von Fusarien in der Literatur erwähnt werden, gehören auch Ammoniumverbindungen (PRATT, 1924; ELPEDINA, 1935; MELVEDEVA, 1937). Der Nitratstickstoff der RICHARDS-Nährlösung wird teilweise in Ammoniak verwandelt. Die Steigerung des pH, die immer bei Reinzüchtung von Fusarien beobachtet wird, ist damit verknüpft.

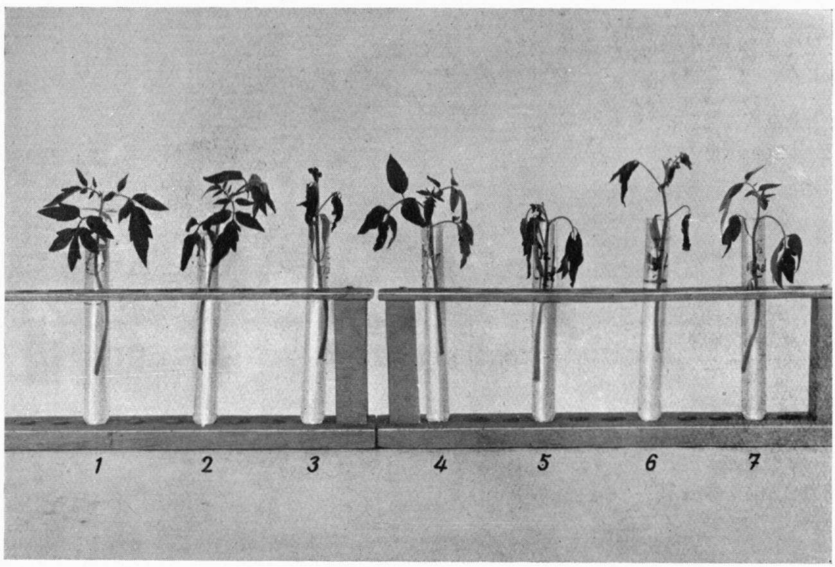
Fusarien können auch Harnstoff bilden (MELVEDEVA, 1937).

Die Extrakte II und III von *Gibberella Saubinetii* und *F. trichothecioides* zeigten auf Zusatz von Nesslers Reagens eine orange Fällung, die bei Anwesenheit von reduzierenden Zuckern in die graue Farbe des reduzierten Quecksilbers überging. Die Kohle- und Seitzfiltereluate des Extrakts II wiesen jedoch, wie bereits im fünften Abschnitt erwähnt, mit Nesslers Reagens keine Ammoniakreaktion mehr auf. Dies deutet schon darauf hin, dass die atmungsaktivierenden und -hemmenden Faktoren dieses Extrakts zu ammoniakalischen Stoffwechselprodukten keine Beziehung haben.

Ausserdem ergaben einige Atmungsversuche mit Ammoniumsalzen und Harnstoff völlig negative Resultate (*Tabelle 58*).

c. *Aminosäuren.* Aus Atmungsversuchen mit abgeschnittenen

TAFEL V.



Giftwirkung der Kulturflüssigkeit von *Fusarium trichothecioides*. Abgeschnittene Tomatenpflanzen in 10 cm^3 der Flüssigkeit + 10 cm^3 Phosphatpuffer (pH 6.2).

Nr. 1: Leitungswasser; Nr. 2: dest. Wasser; Nr. 3: Kulturflüssigkeit (unbehandelt); Nr. 4: Kohlefiltrat; Nr. 5: Kohleeluat; Nr. 6: Seitzfiltrat; Nr. 7: Seitzeluat. Die Nr. 3, 5 und 6 zeigen starke Vergiftungserscheinungen.

Blättern, die mit ihren Blattstielen in Aminosäure-Lösungen eingesetzt waren, glaubten SPOEHR u. MC.GEE (1923) schliessen zu können, dass Aminosäuren einen aktivierenden Einfluss auf die Atmung ausüben können.

Unsere Extrakte I und III enthalten, neben anderen organischen Stoffen, zweifellos auch Aminosäuren. Daher wurden einige Versuche mit einer Anzahl dieser Verbindungen durchgeführt (*Tabelle 58*). Die Effekte sind jedoch unbedeutend. Die höchste Wirkung erzielte eine gesättigte Cystine-Lösung (Löslichkeit < 0.1 %); diese Erhöhung ist jedoch ohne Bedeutung im Vergleich zu dem Effekt der Pilzextrakte.

Die Unwirksamkeit von Asparagin und l-Histidin wurde oben bereits mitgeteilt. AHMET (1933) fand in den Kulturflüssigkeiten von *F. bulb. var. lycopersici* und *F. vasinfectum* praktisch keine Aminosäuren.

Nach diesen Tatsachen ist es unwahrscheinlich, dass die Pilzextrakte ihre atmungsaktivierende Wirkung dem Aminosäuregehalt zu verdanken hätten. Dies gilt nur für Aminosäuren im allgemeinen; es bleibt denkbar, dass bestimmte Aminosäuren, die oben nicht zur Prüfung gelangten, wie z.B. β-Alanin, eine spezifische Wirkung aufweisen.

d. *Phenolderivate.* Im Zusammenhang mit der Redoxwirkung vieler Phenolderivate werden die Ergebnisse einiger Atmungsversuche mit zwei reduzierenden Phenolverbindungen in *Tabelle 58* mit aufgenommen. Es handelt sich um p-Phenylendiamin und p-Oxyphenylglycin, die als Entwickler in der Photographie Anwendung finden. Beide zeigen einen erheblichen Sauerstoffmehrverbrauch. p-Phenylendiamin gibt auch in starker Verdünnung einen deutlichen Effekt. Diese Erscheinung wäre auf den ersten Blick der Oxydation dieser leicht oxydierbaren Verbindungen zuzuschreiben. Auch die Dunkelfärbung der Suspensionsflüssigkeit während des Versuchs deutet darauf hin. Zwei R.Q.-Bestimmungen nach Zusatz von 1.5 mg p-Phenylendiamin ergaben jedoch je einen Wert von 0.95. Dieses Resultat weist also nach, dass der bedeutend gesteigerte O_2-Verbrauch nicht nur etwa auf eine irreversibele Oxydation des zugesetzten Stoffes (wie im Falle der Ascorbinsäure), sondern grösstenteils auf einen beschleunigten Atmungsvorgang zurückzuführen ist. Ein kleiner Teil des verbrauchten Sauerstoffs (etwa 5 %) kann allerdings bei der Oxydation und Dunkelfärbung des Amins (reversibel oder irreversibel) festgelegt sein, da die O_2-Aufnahme die CO_2-Abgabe mit 5 % übersteigt.

Diese Darstellung wird durch folgende Erwägung unterstützt. Der Zusatz von 15 γ p-Phenylendiamin erzielt bereits in 2 Stunden

einen Mehrverbrauch von ca. 40% = etwa 18 mm^3 O_2; 15 γ verbrauchen zur vollständigen Oxydation nur etwa 3.2 mm^3 O_2. In 2 Stunden war der Mehrverbrauch also schon bedeutend höher als die zur Totaloxydation benötigte Menge Sauerstoff. Ausserdem war die Atmungskurve noch im Steigen begriffen. Es scheint uns hier die Annahme berechtigt, dass das p-Phenylendiamin auf irgend eine Weise in den normalen respiratorischen Stoffwechsel der Kartoffel eingeschaltet wird, nicht als Energielieferant, sondern als ein Redoxsystem, das die Atmungsintensität erhöht.

Eine gewisse Parallele ersieht man aus der Wirkung des Brenzcatechins und eines anderen o-Dioxyphenols (aus Kartoffeln isoliert) auf die Atmung des Kartoffelgewebes. Wie aus der Arbeit von BOSWELL u. WHITING (1938) hervorgeht, führen diese Verbindungen eine Atmungssteigerung herbei, ohne den Atmungsquotienten zu ändern. Im Falle des Brenzcatechins tritt bald eine Atmungshemmung auf, die in der Giftwirkung des entstehenden o-Chinons ihre Erklärung findet und die an der Atmungserhöhung grundsätzlich nichts ändert.

Die Atmungserhöhung durch das isolierte o-Dioxyphenol belief sich in den Versuchen dieser Forscher schliesslich auf etwa 20 % über der normalen Atmung in Phosphatpuffer, nachdem sie bei hohen Konzentrationen anfänglich noch bedeutend höher gewesen war. Diese konstant bleibende höhere Atmungsgeschwindigkeit deutet nach diesen Forschern darauf hin, dass die Phenolverbindung in ein zyklisches System aufgenommen wird, in dem sie wechselweise oxydiert und reduziert wird (Mesokatalysator). Es handelt sich dabei um das schon früher erwähnte Polyphenoloxydasesystem. Ein ähnlicher Vorgang wäre nach Zusatz der p-Phenolderivate in unseren Versuchen denkbar. Denn die Polyphenoloxydase, die nach BOSWELL u. WHITING bei der normalen Kartoffelatmung eine Hauptrolle spielt, oxydiert neben ortho- auch para-Diphenole (SUTTER, 1936).

ABSCHNITT X.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE.

Kehren wir jetzt zum Ausgangspunkt dieser Arbeit zurück. Wir fragten uns: welche physiologische Wirkungen übt der parasitische Pilz (in diesem Falle *Gibberella Saubinetii*) auf die Wirtspflanze (Kartoffelknolle) aus? Unsere Aufmerksamkeit beschränkte sich au die Atmung und wir stellten zunächst in Abschn. IV fest, dass im

Einklang mit den Ergebnissen anderer Forscher erkrankte Pflanzenteile eine erheblich stärkere Atmung aufweisen als gesunde. Bei der Analyse dieser Erscheinung fangen jedoch die Schwierigkeiten an. In die Atmung des erkrankten Gewebes ist die Atmung des Krankheitserregers mit einbegriffen. Um zu entscheiden, in welchem Masse letztere an der Mehratmung beteiligt ist, müsste man die eigene Atmung des Pilzes bestimmen. Diese Aufgabe war in vorliegendem Falle unausführbar, obwohl es von vornherein wahrscheinlich war — wie auch FISCHER u. GÄUMANN (1929) betonen — dass die Pilzatmung im allgemeinen nicht für die gesamte Mehratmung verantwortlich ist.

Zweitens kann die Steigerung der Atmungsgeschwindigkeit des Wirtspflanzengewebes seitens des Parasiten physisch, sowohl als chemisch herbeigeführt werden. Der Einfluss der Pilzbesiedelung könnte entweder auf einer rein-mechanischen Verbesserung des Gaswechsels — wie bei der Atmungserhöhung angeschnittener Pflanzenteile — oder auf einer Aktivierung des aeroben Stoffwechsels durch eine Ursache chemischer Natur beruhen.

Um in das Problem einzudringen, haben wir uns bemüht festzustellen ob insbesondere zu letzterer Möglichkeit Gründe vorliegen. *Die Versuche mit den Extrakten I, II und III zeigen, dass der Pilz nicht nur in Reinkultur atmungsaktivierende Stoffe bildet und ausscheidet, sondern dass auch das erkrankte Gewebe derartige Stoffe in bedeutend grösserer Menge enthält, als das gesunde Gewebe.* Wir haben schon öfters hervorgehoben, dass es sich in diesen Versuchen tatsächlich um Atmungsaktivierung und nicht bloss um Oxydationen handelt, während auch mehrmals darauf hingewiesen wurde, dass die Atmungseffekte nicht auf einer Bakterienatmung beruhen.

Die nächsten Fragen betreffen *die Wirkungsweise*, *die Bedeutung für die Wirtspflanze* und *die Natur der fraglichen Substanzen.*

Die Grösse der aeroben Atmung wird, bei bestimmter Temperatur, von den folgenden Faktoren bestimmt: Sauerstoffzutritt und Kohlensäureabfuhr, Substratversorgung, pH und Enzymsystem. Die Anwendung dünner Gewebescheibchen und die hohe Schüttelgeschwindigkeit in unseren Versuchen eliminierte die Möglichkeit von Diffusionseffekten durch den Extraktzusatz; die Pufferwirkung der Suspensionsflüssigkeit hielt das pH im Atmungsmilieu aufrecht.

Die Wirkung der Extrakte ist somit entweder auf einen Einfluss auf das Atmungsenzymsystem (einschliesslich des Redoxpotentials), oder auf eine Erweiterung der Substratzufuhr zurückzuführen.

Als Atmungssubstrat für stärkereiche Speicherorgane — wie die Kartoffelknolle — kommen durchaus nur Kohlehydrate in Frage.

Tatsächlich zeigten Kartoffelschnitten nach Zuckerzusatz eine gewisse Atmungssteigerung („Zuckereffekt", Abschn. VII). Dennoch glauben wir hinreichend klar gemacht zu haben, dass die Wirkung der Extrakte nicht in erster Linie auf Substratzusatz beruht. Der hohe Atmungseffekt, die Aktivität in Verdünnung, die Adsorbierbarkeit der aktiven Stoffe, die Erfahrungen mit der Bariumfällung, die Wirkung der zuckerfreien Extrakte I und II, die ziemlich konstante Erhöhung der Atmungsgrösse, alle diese Tatsachen, die aus Abschnitten V und VI hervorgehen, deuten auf die Zulässigkeit dieser Annahme hin. Ausserdem trägt folgende kleine Berechnung noch dazu bei. In einem Versuch wurde nach Zusatz des stark-verdünnten Extrakts I in 3 Stunden eine Mehratmung von 11.4 mm^3 Sauerstoff erzielt. Dieselbe Menge O_2 ist für die vollständige Oxydation von 14 γ des hochwertigen Atmungssubstrats Glukose benötigt. Der Zusatz enthielt jedoch nur 10 γ Trockensubstanz, von der gewiss nur ein Bruchteil als aktiver Stoff in Betracht kam. *Es handelt sich hier somit offenbar nicht um Zusatz einer Substanz, die veratmet wird.* Jedoch bleibt noch die Möglichkeit, dass die aktiven Stoffe der Extrakte mit dem zur Verfügung stellen des Atmungssubstrats in der Zelle verknüpft sind. Im Zusammenhang mit dem Auftreten des Zuckereffekts neben dem Extraktfaktor als „begrenzender Faktor" (im Sinne BLACKMANS, 1905) wurde bereits in Abschn. VII (s. S. 255) darauf hingewiesen, dass der Extraktfactor irgendwie mit der Substratbereitsetzung verbunden sein musste. Diese Anschauung stützt sich jedoch auf die Lehre BLACKMANS, deren scharfe Gültigkeit seit langem umstritten wird (u.a. von ROMELL, 1926). Wie dem auch sei, es bleibt denkbar, dass die Extraktwirkung mit der Substratlieferung zu tun hat, ohne dass mit den Extrakten auch Atmungssubstrat zugesetzt wurde.

Als weitere Erklärungsmöglichkeit der Extraktwirkung kommt die Beeinflussung des Atmungssystems in Frage. Im fünften Abschnitt wurde wahrscheinlich gemacht, dass die Wirkung des Myzelextrakts sich auf das Polyphenoloxydasesystem der Kartoffel bezieht. BOSWELL u. WHITING (1938) stellten fest, dass Brenzcatechin und ein anderes o-Diphenol — aus Kartoffeln isoliert — die Atmungsgeschwindigkeit des Kartoffelgewebes merklich steigern. Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, ergab sich aus ihren Versuchen eine konstante Atmungserhöhung von etwa 20 % über der normalen Atmungsgrösse. Offensichtlich wurde die Wirkung der Phenole auf diesem Niveau von einem anderen Faktor begrenzt, da Zusatz höherer Konzentrationen keine konstante Erhöhung über diesen 20% herbeiführte. Diese Forscher kommen zu der wichtigen Anschauung, dass die Phenolverbindungen als Redoxsysteme in ein zyklisches Atmungs-

system aufgenommen werden, in dem sie als Sauerstoffüberträger mit einem oxydabelen Produkt der Zelle reagieren. Es ist allerdings bekannt, dass Chinone als ausgezeichnete Akzeptoren für den durch Dehydrasen aktivierten Wasserstoff der Zellsubstrate fungieren können (SUTTER, 1936). Auch die Atmungseffekte der p-Phenolderivate, über die im vorigen Abschnitt berichtet wurde, schrieben wir einer ähnlichen Rolle dieser Verbindungen im Polyphenoloxydasesystem der Kartoffel zu. In diesem Zusammenhang möchten wir noch die Arbeit PLANTEFOLS (1932) erwähnen, aus der hervorgeht, dass 1-2-4-Dinitrophenol die aerobe Atmung des Kohlrabi-Speichergewebes steigert.

Es fragt sich jetzt, ob nicht auch die Wirkung der Extrakte auf Einschaltung eines Redoxsystems zurückgeführt werden kann. Die Phenolverbindungen werden jedoch, wie bekannt, in wässeriger Lösung nach Schütteln mit Luft bald bräunlich. Diese Erscheinung wurde oft beobachtet nach Zusatz der Extrakte III und B. Die Suspensionsflüssigkeit der Kartoffelscheibchen zeigte dann am Ende des Versuchs eine rotbraune Farbe. Diese Beobachtung lässt sich also mit der Anwesenheit in diesen Extrakten von der mehrmals erwähnten o-Diphenolverbindung aus Kartoffeln verbinden. Wir verfügen leider nicht über Angaben, ob der Extrakt III — d.h. des infizierten Gewebes — diesen Stoff in höherer Konzentration als der Kontrolle-Extrakt B enthält. Im Falle der Extrakte I und II konnten wir jedoch niemals eine Spur einer Färbung feststellen, weder in der Suspensionsflüssigkeit, noch in dem Extrakt nach längerem Stehen. Auch ergaben die Extrakte I und II in einem nachträglichen Versuch (die Arbeit BOSWELL u. WHITINGS kam erst nach Abschluss der Atmungsversuche zu unserer Kenntnis), nach Neutralisieren, auf Zusatz einiger Tropfen Eisenchloridlösung nicht die bekannte Farbreaktion auf Phenole (KLEIN, 1932). Diese Tatsachen weisen darauf hin, dass es sich im Falle der Extrakte I und II (und vielleicht auch III) nicht um einfache Phenole handelt.

Andrerseits können einige Erscheinungen in unseren Versuchen durch die Annahme erklärt werden, dass bei dem Atmungseffekt der Extrakte der Zusatz und die Einschaltung eines Redoxsystems vorliegt. So erwähnten wir in Abschn. V-1c einen Versuch mit Gewebebrei, dem Extrakt I zugesetzt wurde. Statt der üblichen starken Atmungserhöhung des intakten Gewebes, ergab sich in diesem Falle nur eine kleine Steigerung — von kurzer Dauer — des Sauerstoffverbrauchs. Diese Erscheinung wäre der Oxydation des zugesetzten Redoxsystems zuzuschreiben; die Zerstörung des Zellgefüges führt die Einstellung der normalen Atmung und damit der Wirksamkeit des zyklischen Systems herbei, sodass auch das

Redoxsystem blockiert würde. Auch die Beobachtung, dass die Atmungserhöhung nach Zusatz grösserer Mengen des Extrakts I oft ein vorübergehendes Zurückfallen zeigt (man siehe den Knick der Atmungskurven in den Fig. 2, 3 u. 5), kann erklärt werden durch die Annahme, dass das zugesetzte Redoxsystem — nach Oxydation — infolge der beschränkten Menge oxydabel Substrat, die zur Verfügung steht, nur zum Teil sofort reduziert und in das zyklische System aufgenommen wird. Erst allmählich wird sich dann ein neues Gleichgewicht zwischen Oxydation des Redoxsystems (d.h. also Sauerstoffmehrverbrauch) und Produktion des oxydabelen Substrats bilden.

Diese Erwägungen stützen sich jedoch auf Beobachtungen, die noch in mancher Beziehung Ergänzung bedürfen. Namentlich das Verhältnis zwischen Zuckereffekt und Extraktwirkung ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Wir wollen uns daher angesichts der *pflanzenphysiologischen* Seite des Problems auf die vorhergehenden Betrachtungen beschränken und uns die *phytopathologische* Seite mal ansehen.

Die Anwesenheit atmungsaktivierender Stoffe im Myzelextrakt von *Gibberella Saubinetii* hat an sich keine phytopathologische Bedeutung, nachdem es sich erwies, dass auch rein-saprophytische Pilze, wie *Trichoderma lignorum* und Hefe derartige Substanzen im Myzel enthalten. Wahrscheinlich handelt es sich hier um Stoffe, die im Pflanzenreich allgemein vorkommen und mit den respiratorischen Lebensvorgängen in der Zelle verknüpft sind. Denn auch aus dem gesunden Kartoffelgewebe lassen sich atmungserhöhende Stoffe extrahieren (Extrakte B und A). Die Aktivität der Kulturflüssigkeit des Pilzes (Extr. II) zeigt aber, dass die fraglichen Substanzen nicht nur in Reinkultur produziert, sondern auch ausgeschieden werden.

Schliesslich haben wir nachgewiesen — und dieser Befund hat gewiss grössere phytopathologische Bedeutung — dass die aktiven Stoffe sich im von *Gibberella Saubinetii* befallenen Gewebe in erheblich grösseren Mengen als im sterilen Gewebe vorfinden. Weiter stellten wir fest, dass die Konzentration im erkrankten Gewebe gross genug ist, um eine bedeutende Atmungssteigerung herbeizuführen.

Die Bildung des wirksamen Prinzips steht also, nach unseren Erfahrungen, zwar nicht im Zusammenhang mit jenen spezifischen Eigenschaften, die den Angriff des Parasiten auf den Wirt ermöglichen, sondern das Auftreten der aktiven Substanzen in merklichen Konzentrationen nachdem der parasitische Pilz sich auf dem Wirt angesiedelt hat, wird ohne Zweifel einen wichtigen Einfluss auf den Stoffwechsel des Wirtsgewebes und damit auf das Wesen der Krankheit ausüben. Kurz gesagt: wenn diese Stoffe auch bei dem *Eintritt*

des parasitischen Verhältnisses keine Rolle spielen, so sind sie gewiss im *weiteren Verlauf* der Erkrankung von grosser physiologischer Bedeutung. Aus diesen Anschauungen geht schon hervor, dass wir glauben, die Wirkung der drei Extrakte einem und demselben Prinzip zuschreiben zu dürfen. Das Verhalten der wirksamen Substanzen dieser Extrakte war in unseren Versuchen nahezu ähnlich; kleine Unterschiede können der Mitanwesenheit sehr verschiedener Verunreinigungen der einzelnen Rohpräparate zugeschrieben werden.

Was die Natur der wirksamen Stoffe — und somit die *chemische* Seite des Problems — anbelangt, so sind die Versuche zur Identifizierung des wirksamen Prinzips völlig negativ verlaufen. Wir haben allerdings festgestellt, dass eine Anzahl Wirkstoffe, unter ihnen Vitamine und Wuchsstoffe, nicht mit der atmungsaktivierenden Wirkung der Extrakte verbunden sind und überhaupt die Atmung nicht in erheblichem Masse beeinflussen.

Mit dem Adsorptions- und Elutionsverfahren haben wir die ersten Schritte auf den Weg zur Reinigung und Anreicherung der aktiven Substanzen getan; neben der Adsorbierbarkeit haben wir einige Eigenschaften der fraglichen Stoffe, wie Thermostabilität und Löslichkeit untersucht. Auch die organisch-chemische Natur steht fest. Diese Angaben boten jedoch noch wenig Anhalt und von der Chemie des wirksamen Prinzips hatten wir noch keine Ahnung.

Neuerdings zeigten PRATT u. WILLIAMS (1939) jedoch, dass Zusatz von sehr geringen Mengen ihrer „Pantothensäure" eine Atmungserhöhung des Kartoffelgewebes herbeiführt. Es handelt sich hier um einen weitverbreiteten Aktivator für das Wachstum von Hefe und von grünen Pflanzen, der sich in den Extrakten vieler biologischen Materialien (auch in Pilzen) vorfindet (JANKE, 1939). Vor kurzem hat man die Struktur dieser Substanz bekannt gegeben (WILLIAMS u. MAJOR, 1940); sie ist ein Derivat von β-Alanin, von der Formel $C_9H_{17}O_5N$. Ihre Eigenschaften sind nicht mit jenen des Extraktfaktors im Widerspruch: die Thermostabilität, die Unlöslichkeit in Äther, die Adsorbierbarkeit, die Wirkung in starker Verdünnung, die physiologische Wirksamkeit als Wachstumsfaktor für Hefe und als Atmungsaktivator für Kartoffelgewebe, das weitverbreitete Vorkommen in biologischen Materialien (vielleicht als universeller Komponent der lebendigen Substanz), das alles deutet auf die Möglichkeit — wenn nicht die Wahrscheinlichkeit — dass das wirksame Prinzip unserer Extrakte mit dieser Pantothensäure identisch ist. Leider haben wir unsere Versuche abschliessen müssen, bevor wir Gelegenheit hatten die Ergebnisse von PRATT u. WILLIAMS auf unsere Arbeit zu übertragen.

Neben dem atmungsaktivierenden Prinzip der Pilzkulturen stiessen

wir auf einen *atmungshemmenden* Faktor, der besonders stark von *Fusarium trichothecioides* produziert wird. Es handelt sich hier offensichtlich um eine „staling" Substanz, also ein toxisches Prinzip, das sich allmählich in der Pilzkultur ansammelt. Durch ihre stärkere Adsorbierbarkeit an Aktivkohle gelang es, diese Substanz vom aktivierenden Prinzip zu trennen. Sie ist hitzebeständig und erregt auch Giftigkeitssymptome auf Tomaten und anderen grünen Pflanzen, die in den Extrakt eingestellt werden. Die schädliche Wirkung entwickelt sich ziemlich langsam und beseitigt schliesslich die atmungsaktivierende Wirkung des Extrakts, sowohl als den Zuckereffekt. Sie ist nicht auf die Anwesenheit von Bicarbonaten zurückzuführen.

Zusammenfassend gelangen wir zum nachfolgenden Bild der atmungserhöhenden Wirkung. Es handelt sich um ein wirksames Prinzip, das als fester Bestandteil des organischen Pilzmaterials auftritt; es wird vom Pilz in Reinkultur gebildet und es findet sich auch im erkrankten Kartoffelgewebe nach Befall durch *Gibberella Saubinetii*. Es steigert die Atmungsgeschwindigkeit der Wirtspflanze und trägt auf diese Weise zu der vielfach nachgewiesenen Atmungssteigerung und damit zu der abnormalen Physiologie des erkrankten Gewebes bei. Die Möglichkeit, dass diese Wirksamkeit auf die Pantothensäure von WILLIAMS zurückzuführen sei, ist sicher nicht ausgeschlossen. Andrerseits liegen Gründe zu der Annahme vor, dass es sich bei dem wirksamen Prinzip um ein Redoxsystem handelt, das — wie bestimmte Phenole — im Atmungssystem aufgenommen die Atmungsgeschwindigkeit steigert.

NACHBETRACHTUNG. Die vollständige Lösung der Ausgangsprobleme überschritt — wie es sich zeigte — weitaus den Rahmen einer beschränkten Untersuchung, auch wenn nicht besondere Umstände uns gezwungen hätten, den experimentellen Teil an einem unvorhergesehenen Zeitpunkt abzubrechen. Viele neue Fragen auf pflanzenphysiologischem, phytopathologischem und chemischem Gebiet traten hervor, die unberücksichtigt bleiben mussten. Die ausgearbeitete Methodik — die Anwendung von pflanzlichen Gewebeschnitten in der WARBURG-Apparatur — und die beschriebenen Ergebnisse werden hoffentlich andere zur Fortsetzung und Ergänzung dieser Arbeit anregen.

Die vorliegende Untersuchung wurde am Phytopathologischen Institut „Willie Commelin Scholten" in Baarn ausgeführt. Unserem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. V. J. KONINGSBERGER, Utrecht,

danken wir für sein stetes Interesse, für das zur Verfügung stellen der Apparatur und für seine Zustimmung, die Arbeit in Baarn ausführen zu dürfen. Auch Fräulein Prof. Dr. JOH. WESTERDIJK, Direktorin des Instituts in Baarn, sagen wir unseren besten Dank für ihr Wohlwollen und ihre Anregung, Herrn Prof. Dr. F. KÖGL, Utrecht, für die freundliche Überlassung von Biotin und einigen anderen Präparaten.

LITERATURVERZEICHNIS.

AHMET, H.: Untersuchungen über Tracheomykosen. 1933, Phytopath. Z. 6, 49.

ALLEN, P. J. & D. R. GODDARD: A respiratory study of powdery mildew of wheat. 1938, Amer. J. of Bot. 25, 613.

ARTSCHWAGER, E.: Studies on the potato tuber. 1924, J. Agric. Res. 27, 809.

BABA, T.: Die Fällung von Zuckern mit methylalkoholischem Bariumhydroxyd. 1935, Biochem. Z. 275, 253.

BARKER, J.: Analytic studies in plant respiration, IV and V: The relation of the respiration of potatoes to the concentration of sugars and to the accumulation of a depressant at low temperatures. Part I, II. 1933, Proc. Roy. Soc. London B. 112, 316.

——: ——. Part III. 1936, Proc. Roy. Soc. London B. 119, 453.

BLACKMAN, F. F.: Optima and limiting factors. 1905, Ann. of Bot. 19, 281.

BOSWELL, J. G. & G. C. WHITING: A study of the polyphenol oxidase system in potato tubers. 1938, Ann. of Bot. N.S. 2, 847.

BROWN, W.: Studies in the physiology of parasitism I. The action of *Botrytis cinerea*. 1915, Ann. of Bot. 29, 313.

——: Studies in the physiology of parasitism IV. On the distribution of cytase in cultures of *Botrytis cinerea*. 1917, Ann. of Bot. 31, 489.

——: The physiology of host-parasite relations. 1936, Bot. Rev. 2, 236.

CALDWELL, J. & J. MEIKLEJOHN: Observations on the oxygen uptake of isolated plant tissue. I. The effect of phosphate and of added carbohydrate. 1937, Ann. of Bot. N.S. 1, 477.

DOUDEROFF, M.: Lactoflavin and bacterial luminescence. 1938, Enzymologia 5, 239.

EGLITS, M.: Der Einfluss der Infektion auf die Temperatur und die Kohlensäureabgabe bei Kartoffeln. 1933, Phytopath. Z. 5, 343.

ELPEDINA, O. K.: On toxins of wilting. 1935, Compt. rend. Acad. sc. U.R.S.S. NS. III, 8, 360 (Ref. Rev. Appl. Myc. 15, 388).

FITTING, H.: Über Auslösung von Protoplasmaströmung bei *Vallisneria* durch einige Histidinverbindungen. 1936, Jahrb. f. wiss. Bot. 82, 613.

FISCHER, ED. u. E. GÄUMANN: Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. 1929, Jena.

FISCHER, F. G.: Niedermolekulare Überträger biologischer Oxydo-Reduktionen und ihre Potentiale. 1939, Erg. d. Enzymf. 8, 186.

FRIES, N.: Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum verschiedener Pilze. 1938, Diss. Uppsala.

GÄUMANN, E.: Über Fieberzustände bei Pflanzen. 1930, Schweiz. Landw. Monatshefte, Heft 12.

GEIGER-HUBER, M.: Über den Einfluss der Konzentration des Atmungs-

materials auf die Atmungsgeschwindigkeit von Pflanzen. 1935, Jahrb. f. wiss. Bot. 81, 1.
GREWE, R.: Das Aneurin (Vitamin B_1). 1937, Erg. d. Physiol. 39, 252.
HEALD, F. D.: Manual of plant diseases. 1933, New York.
HELLINGA, J. J. A.: On the effect of substances, produced by fungi, on the respiration of the tissue of potato tubers. I and II. 1940, Proc. Kon. Nederl. Akad. Wetensch. 43, 249.
HOPKINS, E. F.: Relation of low temperatures to respiration and carbohydrate changes in potato tubers. 1924, Bot. Gaz. 78, 311.
——: Variation in sugar content in potato tubers caused by wounding and its possible relation to respiration. 1927, Bot. Gaz. 84, 75.
HULSSEN, C. J. v.: Ademhaling, gisting en groei. 1936, Diss. Utrecht.
JANKE, A.: Die Wuchsstoff-Frage in der Mikrobiologie. 1939, Zentr.bl. Bakt., Abt. 2, 100, 409.
KLEIN, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse Band II, 1932, Wien.
KÖGL, F. u. B. TÖNNIS: Über das Bios-Problem. Darstellung von krystallisiertem Biotin aus Eigelb. 1936, Zeitschr. f. physiol. Chemie 242, 43.
KOURSSANOW, A. L.: De l'influence de l'*Ustilago tritici* sur les fonctions physiologiques du froment. 1928, Rev. gén. de Bot. 40, 277 et 343.
KUBOWITZ, F.: Über die chemische Zusammensetzung der Kartoffeloxydase. 1937, Biochem. Z. 292, 221.
LEMMON, P.: Respiration of potato tissue in relation to hydrogen-ion concentration of a surrounding solution. 1936, Amer. J. of Bot. 23, 296.
LEPIK, E.: Untersuchungen über den Biochemismus der Kartoffelfäulen. 1. Der Einfluss der *Phytophthora*-Fäule auf die chemische Zusammensetzung der Kartoffelknolle. 1929, Phytopath. Z. 1, 49.
——: ——. 2. Über die Rolle der stickstoffhaltigen Bestandteile der Kartoffelknolle bei der *Phytophthora*-Fäule. 1940, Phytopath. Z. 12, 292.
LOHMANN, K.: Über die biologischen Wirkungen der Co-Carboxylase. 1937, Zeitschr. angew. Chemie 50.
MARESQUELLE, H. J.: Sur les échanges respiratoires des plantes attaquées par les Urédinées. 1928, Compt. rend. Acad. sc. 187, 247.
——: Etudes sur le parasitisme des Urédinées. 1930, Ann. sc. nat., Bot. 10e série, 12, 1.
MELVEDEVA, S.: The toxins of *Fusarium buharicum* and *Fusarium graminearum*. 1937, Compt. rend. Acad. sc. U.R.S.S., NS. XV, 8, 503 (Ref. Rev. Appl. Myc. 16, 827).
NICOLAS, G.: De l'influence qu'exercent les fumagines sur l'assimilation chlorophyllienne et la respiration. 1913, Rev. gén. de Bot. 25, 385.
——: Sur la respiration des plantes parasitées par des champignons. 1920, Compt. rend. Acad. sc. 170, 750.
NOVY, F. G.: Microbic respiration IV. The so-called aerobic growth of anaerobes: potato respiration. 1925, J. infect. dis. 36, 343.
ONSLOW, M. WH.: Oxidising enzymes. I. The nature of the „peroxide" naturally associated with certain direct oxidising systems in plants. 1919, Biochem. J. 13, 1.
ORLA-JENSEN, S., N. C. OTTE u. AGN. SNOG-KJAER: Über Wuchsstoffe in den Peptonen. 1936, Zentr. bl. Bakt., Abt. 2, 94, 452.
PLANTEFOL, L.: Etudes sur l'action du dinitrophenol 1-2-4 (Thermol). VII Action du dinitrophenol 1-2-4 sur la respiration de cellules et tissus végétaux. 1932, Ann. de Phys., Physicochim. Biol. 8, 127.
PRATT, C. A.: The staling of fungal cultures. I, II. 1924, Ann. of Bot. 38. 563 and 599.

PRATT, E. F. & R. J. WILLIAMS: The effects of pantothenic acid on respiratory activity. 1939, J. Gen. Phys. 22, 637.

PRATT, R.: Respiration of wheat infected with powdery mildew. 1938, Science N.S. 88, 62.

RAALTE, M. H. v.: On factors determining the auxin content of the root tip. 1937, Rec. d. trav. bot. néerl. 34, 278.

REINDERS, D. E.: The process of water-intake by discs of potato tuber tissue. 1938, Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. 41, 820.

RICHARDS, H. M.: The respiration of wounded plants. 1896, Ann. of Bot. 10, 531.

ROEMER, TH.,W. H. FUCHS u. K. ISENBECK: Die Züchtung resistenter Rassen der Kulturpflanzen. 1938, Berlin.

ROMELL, L. G.: Über das Zusammenwirken der Produktionsfaktoren. 1926, Jahrb. f. wiss. Bot., 65, 739.

SCHELLENBERG, H. C.: Zur Kenntnis der Winterruhe in den Zweigen einiger Hexenbesen. 1915, Ber. deutsch. Bot. Ges. 33, 118.

SCHNEIDER-ORELLI, O.: Versuche über Wundreiz und Wundverschluss an Pflanzenorganen. 1911, Zentr. bl. Bakt., Abt. 2, 30, 420.

SCHOORL, N.: Organische Analyse II, 1937, Amsterdam.

SCHOPFER, W. H.: Les vitamines cristallisées B comme hormones de croissance chez un microorganisme (*Phycomyces*). 1934, Arch. f. Mikrobiol. 5, 511.

——: Aneurine et hétérotrophie chez les microorganismes. 1938, Arch. f. Mikrobiol. 9, 116.

SPOEHR, H. A. & J. M. MC. GEE: Studies in plant respiration and photosynthesis. 1923, Carn. Inst. of Wash., Publ. No. 325.

STEWARD, F. C.: Diffusion of certain solutes through membranes of living plant cells and its bearing upon certain problems of solute movement in the plant. 1930, Protoplasma 11, 521.

——: The absorption and accumulation of solutes by living plant cells. II. A technique for the study of respiration and salt absorption in storage tissue under controlled environmental conditions. 1932, Protoplasma 15, 497.

——, R. WRIGHT & W. E. BERRY: —— III. The respiration of cut discs of potato tuber in air and immersed in water, with observations upon surface: volume effects and salt accumulation. 1932, Protoplasma 16, 576.

——: —— IV. Surface effects with storage tissue. A quantitative interpretation with respect to respiration and salt absorption. 1933, Protoplasma 17, 436.

——, P. R. STOUT & C. PRESTON: The balance sheet of metabolites for potato discs showing the effect of salts and dissolved oxygen on metabolism at 23° C. 1940, Plant Physiol. 15, 409.

SUTTER, H.: Polyphenol-Oxydase. 1936, Erg. d. Enzymf. 5, 273.

SWEENEY, B. M. & K. V. THIMANN: The effect of auxins on protoplasmic streaming II. 1938, J. Gen. Phys. 21, 439.

SZENT-GYÖRGYI, A. u. K. VIETORISZ: Bemerkungen über die Funktion und Bedeutung der Polyphenoloxydase der Kartoffeln. 1931, Biochem. Z. 233, 236.

THIMANN, K. V. & B. M. SWEENEY: The effect of auxins on protoplasmic streaming I. 1937, J. Gen. Phys. 21, 123.

TURNER, J. S.: The respiratory metabolism of carrot tissue. I. Material and methods. 1938. New Phytol. 37, 232.

WARBURG, O. u. M. YABUSOE: Über die Oxydation von Fruktose in Phosphatlösungen. 1924, Biochem. Z. 146, 380.
——: Über den Stoffwechsel der Tumoren. 1926, Berlin.
——: Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz. 1928, Berlin.
WEIMER, J. L. & L. L. HARTER: Respiration and carbohydrate changes produced in sweet potatoes by *Rhizopus tritici*. 1921, J. Agric. Res. 21, 627.
WILLIAMS, R. J. & R. T. MAJOR: The structure of pantothenic acid. 1940, Science N.S. 91, 246.
YARWOOD, C. E.: Effect of mildew and rust infection on dry weight and respiration of excised clover leaflets. 1934, J. Agric. Res. 49, 549.